

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen
flexiblen kationischen Lipidvesikeln und DNS
sowie *in vitro* und *in vivo* Eigenschaften der
daraus hergestellten Komplexe

Dirk Häfner

aus Bruchsal

2002

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Gregor Cevc betreut.

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 07. August 2002

Dirk Häfner

Dissertation eingereicht am 08. August 2002

- | | |
|--------------|--------------------------|
| 1. Gutachter | Prof. Dr. Gregor Cevc |
| 2. Gutachter | Prof. Dr. Gerhard Winter |

Mündliche Prüfung am 30. Oktober 2002

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Gerhard Winter am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München und unter der Leitung von Prof. Dr. Gregor Cevc bei der IDEA AG in München durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Winter für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis; weiterhin danke ich ihm für seine Betreuung und die zahlreichen Diskussionen und Ratschläge. Ein ebenso herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Cevc für die Überlassung des Themas sowie die kompetente Betreuung und die vielfachen anregenden Gespräche fachlicher und nicht fachlicher Natur. Für die freundliche Aufnahme und die großzügige finanzielle Unterstützung meiner Arbeit möchte ich der gesamten IDEA AG danken. Besonders erwähnen möchte ich dabei Dr. Ulrich Vierl, der mir nicht nur bei technischen Problemen, sondern auch bei diversen Auswertungen am Computer geholfen hat. Mein herzlicher Dank geht auch an Marco Thomann, der mir v.a. beim Durchführen der Analytik für DC-Chol geholfen hat. Aber auch allen anderen „IDEAlisten“ ein herzliches Dankeschön, mir hat die Zeit meiner Promotion in dieser Firma sehr gut gefallen.

Für die Bereitstellung der Plasmid-DNS, für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Zellkulturversuche und für die zahlreichen Diskussionen über Fragen im Rahmen dieser Arbeit danke ich Frau Dr. Juliane Stieber ganz herzlich.

Den Mitarbeitern der Bioservice AG in Martinsried danke ich für die Hilfe bei der Narkose der Mäuse und der Pflege der Tiere während der *in vivo* Versuche.

Ein besonderer Dank gebührt Frau Dr. Heike Fesq für die Einführung in die Präparation der *in vivo* Proben und die tatkräftige Unterstützung bei den Mikroskopie-Versuchen.

Herrn Hutzler von der GSF in Neuherberg danke ich ganz herzlich für seine große Hilfe bei den Versuchen am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop.

1 INHALTSVERZEICHNIS

Danksagung.....	3
1 Inhaltsverzeichnis	4
2 Abbildungsverzeichnis	6
3 Abkürzungsverzeichnis.....	8
4 Einleitung	11
4.1 Gentherapie	11
4.1.1 Definition und Überblick	11
4.1.2 Transportsysteme für die Gentherapie	16
4.1.3 Gentherapie der Haut	23
4.2 Flexible Lipidvesikel.....	27
4.2.1 Zusammensetzung	27
4.2.2 Funktionsweise der flexiblen Lipidvesikel	28
4.3 DNS	31
4.3.1 Aufbau	31
4.3.2 Physikochemische Eigenschaften	33
4.4 Zielsetzung der Arbeit	35
5 Material und Methoden	36
5.1 Geräte	36
5.2 Material	38
5.3 Verwendete Lösungen und Suspensionen.....	40
5.4 Kritische Mizellbildungskonzentration der verwendeten Substanzen	43
5.5 Charakterisierung von kationischen Lipidvesikeln.....	45
5.5.1 Ermittlung der Solubilisierungskurve von SPC-CTAB – Vesikeln.....	45
5.5.2 Rezepturfindung für die SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel	46
5.6 Herstellung von flexiblen Vesikeln.....	47
5.7 Aufbereitung der verwendeten DNS.....	49
5.8 Kinetik der DNS-Adsorption an kationische Vesikel	51
5.9 Größenmessung der Vesikel mittels Photonenkorrelationsspektroskopie	52
5.10 Penetration Assay.....	55
5.10.1 Analytik der Vesikel	57
5.11 In vitro Experimente mit Zellkulturen (HEK-Zellen)	65
5.12 In vivo Experimente mit Mäusen.....	67
5.13 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie.....	69

6	Ergebnisse und Diskussion	72
6.1	Kritische Mizellbildungskonzentration der verwendeten Substanzen	72
6.2	Charakterisierung von kationischen Lipidvesikeln.....	76
6.2.1	SPC-CTAB – Vesikel	76
6.2.2	SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel.....	77
6.3	Aufbereitung der DNS.....	78
6.4	Messung der Adsorptionskinetik von DNS an kationische Vesikel.....	80
6.4.1	CTAB-SPC – Vesikel	80
6.4.2	SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel.....	86
6.5	Größenmessung der Vesikel mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	88
6.5.1	SPC-CTAB – Vesikel	88
6.5.2	SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel.....	89
6.6	Penetration Assay	94
6.6.1	SPC-CTAB – Vesikel	94
6.6.2	SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel.....	96
6.6.3	Analytik der Vesikel	98
6.7	<i>In vitro</i> Experimente mit Zellkulturen (HEK-Zellen)	106
6.8	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	109
7	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	115
8	Literatur	119
9	Anhang	125

2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Gentherapie <i>in vitro</i> (am Beispiel der Leber)	11
Abbildung 2: Gentherapie <i>in vivo</i> (am Beispiel der Lunge)	12
Abbildung 3: Querschnitt der Epidermis mit Verteilung des Wassergradienten	24
Abbildung 4: Mizellen, Liposomen und flexible Lipidvesikel im Vergleich	27
Abbildung 5: Strukturformeln einiger Phospholipide	28
Abbildung 6: Unterschiede zwischen Liposomen und flexiblen Lipidvesikeln	29
Abbildung 7: Funktionsweise der Penetration von flexiblen Vesikeln	30
Abbildung 8: DNS (Purin- und Pyrimidin-Basen, Basenpaarungen, DNS-Doppelstrang) ..	31
Abbildung 9: Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Vesikel-Bestandteile	39
Abbildung 10: Solubilisierungskurve eines Phospholipids durch ein Detergens	45
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Penetration-Assay	55
Abbildung 12: UV-Spektren von CTAB – Lipidvesikeln und von DNS	57
Abbildung 13: UV-Spektren von SPC, Polysorbat und DC-Chol	59
Abbildung 14: UV-Spektren von verschiedenen SPC/Polysorbat – Mischungen	60
Abbildung 15: Reaktionsmechanismus für die Bestimmung von DC-Chol	61
Abbildung 16: Zeitabhängigkeit der DC-Chol – Färbung	63
Abbildung 17: Kalibriergerade von DC-Chol (mit Zusatz von SPC und Polysorbat)	63
Abbildung 18: Strahlengang im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop	69
Abbildung 19: CMC – Bestimmung von CTAB in 50 mM Phosphatpuffer	72
Abbildung 20: CMC von CTAB in Abhängigkeit von der Ionenstärke	73
Abbildung 21: CMC – Bestimmung von DC-Chol mit DPH und PNA	73
Abbildung 22: Solubilisierungskurve von SPC mit CTAB	76
Abbildung 23: Effekte der verschiedenen DNS – Fragmentierungsverfahren	78
Abbildung 24: Titration einer CTAB – Vesikelsuspension mit DNS	81
Abbildung 25: Kinetik der DNS – Adsorption an CTAB – Vesikel (TL 0,2 %)	82
Abbildung 26: Geschwindigkeitsraten der DNS – Adsorption in Abhängigkeit der DNS – Menge	83
Abbildung 27: Kinetik der DNS – Adsorption an CTAB – Vesikel (TL 0,6 %)	84
Abbildung 28: DNS-Adsorptionskinetik in Abhängigkeit von TL und DNS – Menge	85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 29: Kinetik der DNS – Adsorption an SPC-Polysorbat-DC-Chol-Vesikel.....	86
Abbildung 30: Größe und Polydispersitätsindex von CTAB-DNS – Vesikeln	88
Abbildung 31: Radien und PI verschiedener DNS-DC-Chol – Vesikel nach dem Mischen ..	90
Abbildung 32: Änderung von Radius und PI von DC-Chol – Vesikel mit Plasmid – DNS...	90
Abbildung 33: Radius und PI der 30/24/z – Formulierungen kurz nach der Herstellung.....	92
Abbildung 34: Partikelradien von SPC/Polysorbat/DC-Chol – Vesikeln verschiedener Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Zeit nach DNS-Zugabe	93
Abbildung 35: relative Penetrationsfähigkeit von CTAB – Vesikeln.....	94
Abbildung 36: Penetration von CTAB – Vesikeln mit und ohne DNS	95
Abbildung 37: Penetration von DC-Chol – Vesikel unterschiedlicher Zusammensetzung....	96
Abbildung 38: Spektren der SPC/Polysorbat/DC-Chol – Vesikel nach verschiedenen Maßnahmen.....	100
Abbildung 39: Spektren von mit DNS beladenen DC-Chol – Vesikeln (TL 1 %).....	101
Abbildung 40: Spektren von mit DNS beladenen DC-Chol – Vesikeln (TL 10 %).....	102
Abbildung 41: SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/4 + GFP-Plasmid	112
Abbildung 42: SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/4 (unmarkiert) + GFP-Plasmid	112
Abbildung 43: reine GFP-Plasmid DNS ohne Vesikel.....	113
Abbildung 44: SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/24/6 ohne DNS	114
Abbildung 45: SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/24/3 mit red-FP – Plasmid-DNS.....	114

3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Fläche
A _{... nm}	Absorption bei ... nm
A [*]	spezifische Absorption
AA – Viren	adenoassoziierte Viren
Ac ₂ O	Acetanhydrid
ADA-Mangel	AdenosinDesaminase – Mangel
Anal.lsg.	Analysenlösung
bp	Basenpaar
BRCA-Gen	Brustkrebs (breast cancer) – Gen
bzw.	beziehungsweise
c _x	Konzentration des Stoffes x
CFP	cyan fluoreszierendes Protein (cyan fluorescent protein)
CFTR – Gen	Zystische Fibrose Transport Regulations-Gen (cystic fibrosis transport regulation gene)
CLSM	konfokale Laser Scanning Mikroskopie (confocal laser scanning microscopy)
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration (critical micelle concentration)
CONTIN	Contin – Analyse bei der Photonenkorrelationsspektroskopie
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CUM	Cumulanten – Analyse bei der Photonenkorrelationsspektroskopie
Cy 5	Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung der DNS
DC-Chol	3 beta[N-(N',N'-Dimethylaminoethan)carbamoyl]-Cholesterol
DEAE-Dextran	Diethylaminoethyl-Dextran
DNS	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DDAB	Dimethyldioctadecylammoniumbromid
DOGS	Dioctadecylamidoglycylspermin
DOPE	1,2-Dioleoyl-3-phosphatidylethanolamin
DOPC	1,2-Dioleoyl-3-phosphatidylcholin
DOSPA	2,3-Dioleoyloxy-N-[2(spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propan-aminiumtrifluoracetat
DOTAP	N-(1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammoniumpropan
DOTMA	N-(1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammoniumchlorid
DPH	Diphenylhexatrien
η	Viskosität

Abkürzungsverzeichnis

e	Eulersche Zahl (2,71828..)
E. coli	Escherichia coli
Emiss.	Emission
EtBr	Ethidiumbromid
Exzit.	Exzitation
Fluor.e.	Fluoreszenzeinheiten
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
HIV	menschliches Immunschwäche-Virus (human immunodeficiency virus)
HEK – Zellen	Humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney)
HS – Viren	Herpes simplex Viren
ILT – Analyse	Inverse Laplace Transformation bei der Photonenkorrelationsspektroskopie
Isoprop.	Isopropanol
kbp	Kilobasenpaar (kilo basepair)
kHz	Kilohertz
λ	Wellenlänge
L	Liter
LDL	Lipoprotein mit niedriger Dichte (low density lipoprotein)
Lsg.	Lösung
m	Masse
(m)M	(milli)molar
m/m	Masse/Masse
MEM	Eagle's Minimal Essential Medium (mit 10 % fetalem Kälberserum)
Min	Minute(n)
Mitt.wert	Mittelwert
MPa	MegaPascal
n	Anzahl Messungen
n_x	Stoffmenge [mol] eines Stoffes x
N_A	Avogadrozahl ($6,023 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
Na_2EDTA	Dinatrium-Ethylendiamintetraessigsäure
NMRI – Mäuse	Mäuse, die ursprünglich vom Naval Medical Research Institute stammen
o.g.	oben genannt
π	Kreiszahl (3,1415...)
p	Druck
P	Penetration

Abkürzungsverzeichnis

PA	Penetration-Assay
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie (photon correlation spectroscopy)
Ph.puffer	Phosphatpuffer
PI	Polydispersitätsindex
PNA	N-Phenyl-Naphtylamin
r	Radius
r. E.	relative Einheiten
RNA	Ribonukleinsäure
red-FP	rot fluoreszierendes Protein (red fluorescent protein)
rel. Br.	relative Breite (der Contin – Analyse)
rel. St.abw.	relative Standardabweichung
Rh-DHPE	Rhodamin B 1,2-Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-Phosphoethanolamin, Triethylammoniumsalz
$\sigma_{\text{rel.}}$	relative Standardabweichung
s.	siehe
s.o./ s.u.	siehe oben/ siehe unten
sog.	so genannte(r)
SPC	Sojaphosphatidylcholin (Lecithin)
Stand.abweich.	Standardabweichung
Susp.	Suspension
T	Transmission
t	Zeit
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA – Puffer
TEWL	transepidermaler Wasserverlust (transepidermal water loss)
THF	Tetrahydrofuran
TL – Gehalt	Gesamtlipidgehalt (Total lipid)
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TTS	Transdermales Therapeutisches System
u.a.	unter anderem
u.g.	unten genannt
UV	Ultraviolett
V	Volumen
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

4 EINLEITUNG

4.1 Gentherapie

4.1.1 Definition und Überblick

Gentherapie bezeichnet eine Therapiemöglichkeit, bei der Veränderungen des Erbgutes in den Körperzellen eines Organismus vorgenommen werden. Dabei wird dort ein Gen ausgetauscht oder ein zusätzliches Gen eingebaut. Statt also ein Protein direkt zu verabreichen, wird dem Körper die Erbinformation für das gewünschte Protein zugeführt und er stellt daraus selbst das Protein her, was im günstigsten Fall zur Heilung einer Krankheit führt.

Grundsätzlich muß unterschieden werden, welche Art von Zellen zu behandeln sind: werden genetische Veränderungen an ausdifferenzierten Gewebezellen vorgenommen, so spricht man von somatischer Gentherapie; die in die Gewebezellen eingebrachten Gene werden nicht vererbt, die Effekte der Therapie bleiben auf das behandelte Individuum beschränkt. Im Gegensatz dazu steht die Therapie von Keimbahnzellen (Ei- und Samenzellen), deren Veränderung auf die Nachkommen vererbt wird. Diese Art der Therapie ist in Deutschland aus ethischen Gründen durch das Embryonenschutzgesetz verboten.

Eine weitere Möglichkeit der Einteilung besteht bezüglich der Art der Behandlung. Dabei wird zwischen einer *in vitro* und einer *in vivo* Gentherapie unterschieden [1]. Bei der *in vitro* Gentherapie werden dem Patienten z.B. Leberzellen entnommen und ihre Erbinformationen durch Einschleusen oder Reparatur eines Gens außerhalb des Körpers verändert; nach einer eventuellen Vermehrung der veränderten Körperzellen werden diese dem Patienten wieder reimplantiert.

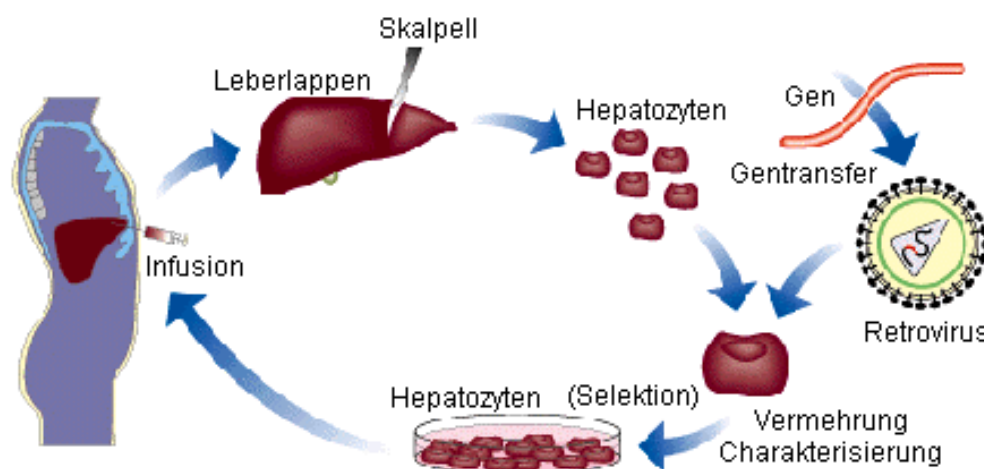


Abbildung 1: Gentherapie *in vitro* (am Beispiel der Leber) (nach [2])

Dabei wird der eigentliche Defekt zwar meist nicht behoben, da das defekte Gen nicht in allen Zellen gegen eine intakte Kopie ausgetauscht wird, die Symptome können jedoch häufig gelindert oder unterdrückt werden. Diese Art der Therapie ist besonders geeignet für leicht zugängliche Zellen wie Blutzellen oder Zellen aus der Leber, dem Knochenmark bzw. der Haut. Die *in vitro* – Therapie ist zeit- und kostenintensiver als die *in vivo* Therapie, dafür aber auch erfolgreicher, da das defekte Gen bei der *in vitro* – Therapie bei einer größeren Anzahl Zellen ausgetauscht wird als bei der *in vivo* Therapie.

Das erste erfolgreiche *in vitro* Experiment fand im Jahr 1990 statt [3]: damals wurde ein kleines Mädchen mit der seltenen angeborenen Immunschwäche ADA [= Adenosin-Desaminase-Mangel] behandelt. Der Vierjährigen wurden Lymphozyten entnommen und diese gentechnisch verändert, indem ein Vektor DNS mit dem intakten Gen in die Lymphozyten einschleuste. Danach wurden der Patientin die veränderten Blutzellen wieder injiziert. Das heute 16jährige Mädchen kann – unterstützt durch eine medikamentöse Therapie – ein weitgehend normales Leben führen. Die Gentherapie muß jedoch ein bis zwei Mal pro Jahr wiederholt werden, da die Lymphozyten nur eine begrenzte Lebensdauer besitzen.

Seit diesem ersten Versuch wurden bis Ende 2000 weltweit rund 4000 Personen in etwa 400 Studien mit Hilfe der Gentherapie behandelt. Leider war jedoch bei keinem der beteiligten Patienten eine vollständige und dauerhafte Heilung zu beobachten.

Bei der *in vivo* Gentherapie hingegen findet die Therapie direkt im Körper des Patienten statt. Die Mukoviszidose ist eine Erbkrankheit, bei der die *in vivo* Gentherapie hauptsächlich angewandt wird. Das liegt daran, daß die Krankheit monogenetisch ist und sich der Gendefekt vorwiegend in der Lunge manifestiert. Zur Behandlung der Mukoviszidose verpackt man ein Gen in ein Adenovirus und verabreicht es dann als Aerosol [4]. Wird das Gen bei dieser Art der Verabreichung dauerhaft in die Erbsubstanz der Lungenepithelzellen eingebaut, so ist damit eine Heilung dieser Erbkrankheit denkbar.

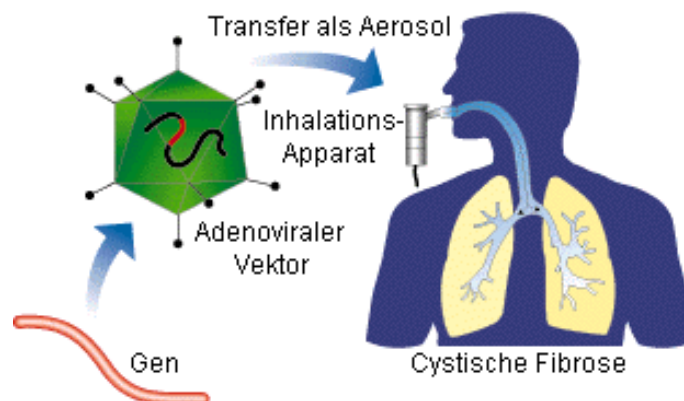


Abbildung 2: Gentherapie *in vivo* (am Beispiel der Lunge) (nach [2])

Eine weitere Einteilung ist die in eine autogene, allogene oder xenogene Behandlung. Autogen bedeutet, daß körpereigene Zellen gentechnisch verändert werden; bei der allogenen Behandlung sind es körperfremde Zellen, z.B. von einem Spender. Bei der xenogenen Form werden Spenderzellen eines Individuums einer anderen Art, z.B. von einem Tier, verwendet. So ist bekannt, daß Hunde in der Lage sind, ein Enzym zu synthetisieren, das Harnsäure abbaut, eine Fähigkeit, die Menschen nicht haben. Mit Hilfe der xenogenen Gentherapie könnte man dieses Gen in die Zellen von Patienten einschleusen, die aufgrund zu hoher Harnsäurespiegel im Blut ein stark erhöhtes Risiko haben, an Nierensteinen bzw. Gicht zu erkranken. Vorstellbare Einsatzmöglichkeiten der Gentherapie sind:

1. Erbkrankheiten:

Diese lassen sich in monogenetische und nicht monogenetische Erbkrankheiten unterteilen. Bei den monogenetischen Krankheiten handelt es sich um Erbkrankheiten, die durch eine Mutation in nur *einem* Gen verursacht werden. Dies ist z.B. bei folgenden Krankheiten gegeben:

- *Cystische Fibrose* (= Mukoviszidose): Hierbei handelt es sich um einen Defekt im sog. *Cystic Fibrosis Transport Regulation* [CFTR] – Gen, das für einen Ionenkanal codiert, welcher den Transport von Chloridionen durch die Zellmembran von Schleimhautepithelzellen in der Lunge und im Gastrointestinaltrakt reguliert. Dieser Defekt führt zu einer ausgeprägten Eindickung des Sekrets in den Atemwegen, was gehäufte Lungeninfektionen nach sich zieht; die Häufigkeit dieser Krankheit beträgt etwa 1:2000, sie ist damit die häufigste Erbkrankheit von Kaukasiern. Mit der Gentherapie verbindet sich die Hoffnung, ein inhalierbares Aerosol zu entwickeln, das zur Reparatur des Gendefektes wenigstens an den Atemwegsepithelien führt. Dies ist jedoch angesichts des zähflüssigen Schleims, der die zu transfizierenden Zellen bedeckt, äußerst schwierig. Außerdem sind nur etwa 2 % der Lungenepithelzellen teilungsaktiv und damit in der Lage, ein zugeführtes Gen in ihrem Zellkern aufzunehmen, was eine dauerhafte Therapie stark erschwert [5].
- *Morbus Gaucher*: Dabei liegt ein Mangel des Enzyms Glucocerebrosidase vor, was zur Akkumulation von Cerebrosiden, also Glykolipiden aus Ceramiden und Galaktose, in den Körperzellen führt und schwere Stoffwechselstörungen mit sich bringt.
- *Sichelzellanämie*: Dies ist die häufigste Erbkrankheit bei Schwarzen. Dabei liegt abnormes Hämoglobin in den Erythrozyten vor; diese sind unter Sauerstoffentzug sichelzellanartig umgeformt. In dieser Form verstopfen sie die Kapillaren, was zu einer unzureichenden Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff führt und v.a. bei körperlicher Belastung Beschwerden hervorruft [6].

- *Hämophilie 1 (bzw. 2)*: Patienten mit dieser Krankheit fehlt der Blutgerinnungsfaktor VIII (bzw. IX), was zu einer stark erhöhten Blutungsneigung führt. Der Blutgerinnungsfaktor VIII wird normalerweise in den Endothelzellen vieler Organe (Milz, Leber, Niere) gebildet.
- *Familiäre Hypercholesterinämie*: Von dieser Erbkrankheit Betroffene haben einen massiven Mangel an *Low Density Lipoprotein* (LDL)-Rezeptoren, was dazu führt, daß sich Cholesterol schon in sehr frühen Jahren in Form sogenannter Plaques an den Blutgefäßwänden ablagert. Diese massiven Ablagerungen können schließlich dazu führen, daß die Patienten bereits im zweiten Lebensjahrzehnt einen Herzinfarkt erleiden. Die Transfektion einer ausreichend hohen Zahl von Leberzellen mit dem Gen für den LDL – Rezeptor würde die Krankheitsprognose deutlich verbessern.

2. Krebs

Die Behandlung von Krebs mit Hilfe der Genterapie macht bis heute etwa drei Viertel aller Therapieversuche aus. Dabei steht nicht die Reparatur der defekten Zellen im Vordergrund, sondern das Abtöten der entarteten Zellen, wobei die intakten Zellen so wenig wie möglich in Mitleidenschaft gezogen werden sollen. Um dieses Ziel zu erreichen, werden v.a. drei Wege verfolgt [7]:

- Entwicklung einer Tumervakzine, also eines Impfstoffes gegen Krebs; diese Strategie wird v.a. bei Patienten mit Nierenkrebs oder Melanomen genauer untersucht. Dabei wird z.B. eine bestimmte Art der weißen Blutkörperchen, die sogenannten tumorinfiltrierenden Lymphozyten, mit dem Gen für bestimmte Zytokine wie Interleukin 2 ausgestattet. Verabreicht man dem Patienten solche gentechnisch veränderten Lymphozyten, so sorgen die gebildeten Zytokine dafür, daß das Immunsystem sensibler für die Krebszellen wird [8].
- Auslösen der Selbstzerstörung (= Apoptose) von Krebszellen. Dabei wird ein Gen verpflanzt, das für ein Enzym (z.B. Thymidinkinase) codiert. Dieses Enzym kann einen parallel verabreichten Wirkstoff (z.B. Ganciclovir) aktivieren, welcher dann die unerwünschten Zellen abtötet. Die Aktivierung des Wirkstoffs erfolgt durch das Enzym. Da dieses jedoch nur in sich teilenden Zellen synthetisiert wird, ist diese Art der Therapie selektiv und eignet sich v.a. für bislang nicht behandelbaren Gliome, also Tumore im Gehirn; dort teilen sich zwar die Tumorzellen, nicht jedoch die Nervenzellen [9] [10].
- Bei der Entstehung von Krebs liegt oft ein Ungleichgewicht von schädigenden Onkogenen und schützenden Tumor-Suppressor-Genen vor. So unterdrückt z.B. das

BRCA1-Gen das Zellwachstum bei Brust- und Ovarialkarzinomen, weshalb Frauen mit einem Defekt in diesem Gen anfälliger sind für die genannten Krebsarten. In diesen Fällen versucht man, in Tumorzellen ein Tumorsuppressorgen – z.B. das p53-Gen – einzuführen, dessen Produkt die Teilungsaktivität der Zellen hemmt [11]. Ein anderer Ansatz verfolgt die Unterdrückung des sogenannten ras-Gens, dessen Genprodukt am Zellwachstum beteiligt ist; aktivierte ras-Onkogene wurden bei verschiedenen menschlichen Krebsarten gefunden [12].

3. Neurologische Erkrankungen

Bei der Behandlung von neurologischen Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer besteht das grundlegende Problem der Therapie in der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke. Bei Morbus Parkinson könnte man ein Gen einführen, das für die Tyrosin-Hydroxylase codiert und damit im Gehirn Dopamin synthetisiert [13]. Bei Morbus Alzheimer wäre die Verabreichung von Genen für Wachstumsfaktoren denkbar, um die Abbaurate der Nervenzellen zu verlangsamen [14].

Einige Punkte, die für den Erfolg einer Gentherapie von entscheidender Bedeutung sind:

- Identifikation einer Krankheit und des zugrundeliegenden genetischen Defekts
- Konstruktion eines geeigneten Plasmids bzw. viralen Vektors
- Entwicklung eines Transportsystems und dessen Optimierung
- Ermittlung der notwendigen Transfektionseffizienz
- Sicherstellung einer Zell-, Gewebe- oder Organspezifität des Transportsystems
- Dauer der Genexpression
- Expression in sich teilenden bzw. sich nicht teilenden Zellen
- Entzündungsreaktion und/oder Immunantwort aufgrund der Therapie
- Kurzzeit- und Langzeittoxizität des verwendeten Systems

Von all diesen Schritten ist man bei der Identifikation der genetischen Defekte und bei der Konstruktion geeigneter Plasmide schon am weitesten. Auf verschiedene Transportsysteme wird im nächsten Kapitel näher eingegangen. Wie hoch die nötige Transfektionseffizienz sein muß, hängt v.a. von der Krankheit ab, die man gentherapeutisch behandeln möchte. Bei Cystischer Fibrose z.B. haben Untersuchungen ergeben, daß es ausreichen könnte, etwa 5 – 10 % der Lungenepithelzellen erfolgreich zu transfizieren, um die Symptome deutlich zu lindern

[5], wobei dieses Ziel zur Zeit noch in weiter Ferne ist [15]. Bei der Behandlung von Krebs kann jedoch eine einzelne, nicht reparierte Zelle ausreichen, um das Krebswachstum erneut auszulösen.

Eine gewisse Spezifität des Transporters läßt sich bei den nicht-viralen Trägern durch den Einbau bestimmter Liganden in die Membran von Liposomen erreichen. So erhöht sich die Spezifität für Leberzellen durch den Einbau von Galaktose in die Liposomenmembran [16].

Die Dauer der Genexpression läßt bei allen bislang durchgeführten Versuchen zu wünschen übrig, d.h. es ist bis auf Ausnahmefälle wie [17] kaum gelungen, eine Expression der gewünschten DNS über mehr als eine Woche hinweg zu erreichen. Die Gentherapie – selbst wenn sie prinzipiell funktioniert – muß daher mehrfach wiederholt werden [18]. Wie die Expression in sich teilenden bzw. nicht teilenden Zellen und die Dauer der Genexpression durch die Wahl geeigneter Transportsysteme beeinflußt werden kann, wird im folgenden erklärt.

4.1.2 Transportsysteme für die Gentherapie

Schon bald nach den ersten gentherapeutischen Versuchen Ende der 80er Jahre war bekannt, daß einer der wichtigsten Schritte dabei das Einbringen des entsprechenden Gens in die Zielzellen der Patienten ist [19]. Die direkte Aufnahme von DNS in die Zelle ist kaum möglich, weil sowohl die DNS, als auch die äußere Zellmembran negativ geladen sind, was zu einer Abstoßung der DNS führt [20]; die Anwesenheit eines DNS-Transporterproteins in der Plasmamembran reicht für die praktische Anwendung in der Gentherapie nicht aus. Für die Aufnahme von Plasmid-DNS oder Oligonukleotiden in die Zellen wurden daher mehrere Methoden entwickelt; sie lassen sich in physikalische und chemische Verfahren einteilen, zum Einsatz kommen dabei virale und nichtvirale Vektoren:

4.1.2.1 Physikalische Methoden

Zu den physikalischen Methoden zählt neben der ballistischen Injektion das direkte Injizieren von DNS *in vivo*, die Elektroporation *in vitro* und schließlich die Mikroinjektion. Alle Verfahren mit Ausnahme der Mikroinjektion führen dabei zu einem transienten Einbau der DNS in das Genom:

- Ballistische Injektion: Bei einer Transfektion mit Hilfe der sogenannten „gene gun“ [= Partikelkanone] werden 1 – 3 µm große, mit DNS beschichtete Gold- oder Wolfram-Kügelchen unter hohem Druck auf die Zelle geschossen, wodurch die DNS in die Zelle gelangt. Diese Methode wurde ursprünglich für den Gentransfer in Pflanzen entwickelt

[21]. Sie wird heute vorwiegend bei *in vitro* Verfahren angewendet, vereinzelt aber auch für *in vivo* Versuche herangezogen.

- Direkte Injektion: Bei der direkten Injektion wird die DNS mit einer Injektionsnadel direkt in das zu behandelnde Gewebe eingebracht [22]. Diese Methode wird für genetische Vakzinierungen erprobt und führt bei der Injektion nackter DNS direkt in verschiedene Organe, v.a. Muskel und Haut, zur Produktion des gewünschten Proteins. Dabei stellte sich im Rahmen von Vakzinierungsstudien heraus, daß unterschiedliche Applikationsarten zu verschiedenen Immunantworten führten: so führte die i.m. Injektion eines Impfstoffs v.a. zu einer Produktion von TH₁ – Helferzellen, während derselbe Impfstoff – mittels Gene-Gun verabreicht – eine ausgewogene TH₁/TH₂ – Antwort hervorruft [23] [24]. Wie die DNS bei der Injektion nackter DNS trotz der oben erwähnten Abstoßung in die Zellen gelangt, ist noch nicht geklärt. Mögliche Ursachen könnten eine geringfügige Verletzung des Gewebes oder der erhöhte Druck an der Injektionsstelle sein. Integration und Expression sind bei dieser Methode jedoch zufällig und nicht steuerbar.
- Elektroporation: Bei dieser *in vitro* Methode werden die Zellmembranen in einem Medium, das die zu übertragende DNS enthält, über kurze Stromstöße destabilisiert, was das Eindringen der DNS in die Zellen ermöglicht, die letztgenannten aber stark schädigen kann [25].
- Mikroinjektion: Auch hier handelt es sich um ein *in vitro* Verfahren. Bei der Mikroinjektion wird DNS mit Hilfe einer Mikropipette direkt in einzelne Zellen injiziert, was zwar für eine gute Transfektionsrate sorgt, aber äußerst aufwendig ist [26].

4.1.2.2 Chemische Methoden

Dazu zählen die Diethylaminoethyl [DEAE]-Dextran- und die Calciumphosphat-Methode, die beide nur für eine *in vitro* Anwendung in Frage kommen. Die Idee dabei ist, die negativ geladene DNS durch Zusatz von gegensätzlich geladenen Chemikalien zu neutralisieren und dadurch zu kondensieren, so daß sie von der Zelle leichter aufgenommen werden kann.

DEAE-Dextran, ein Kohlenhydratpolymer mit angekoppelten positiv geladenen Diethylaminoethyl-Gruppen, ist eine solche Chemikalie; statt DEAE-Dextran läßt sich auch Calciumphosphat verwenden [27]. In beiden Fällen bildet sich ein feiner Niederschlag, der den in einem Nährmedium wachsenden Zellen zugegeben wird und dann mittels Phagozytose in das Zellinnere gelangt [28].

4.1.2.3 Virale Methoden

Zur Zeit die größte Bedeutung in der Gentherapie haben virale Transfektionssysteme [29]. Dem Einsatz solcher Transporter liegt der Gedanke zugrunde, daß Viren von Natur aus die Eigenschaft haben, in Zellen einzudringen und dort genetisches Material freizusetzen bzw. zu aktivieren. Da Viren aber auch gefährliche Krankheitserreger sind, hat der menschliche Körper Abwehrmechanismen entwickelt, die auch gegen die als Genträger genutzten Viren gerichtet sind. Außerdem erreichen nicht alle Viren ihre Zielzellen. Teilweise sind daher sehr hohe Dosen von mit DNS beladenen Viren notwendig. Dem 18-jährigen Amerikaner Jesse Gelsinger, der wegen einer Lebererkrankung mit Adenoviren (s.u.) behandelt wurde, wurden im Herbst 1999 einige Milliarden Viruspartikel gespritzt. Diese Viren wurden aufgrund ihrer hohen Transfektionsfähigkeit verwendet. Der Patient starb jedoch bereits wenige Stunden nach der Injektion der Viruspartikel in die Blutbahn. Bei der Untersuchung des Falls stellte sich heraus, daß dies eine Folge der Therapie war: da die verabreichte Menge an Viruspartikeln für den Patienten einer massiven Virusinfektion gleichkam [30], reagierte das Immunsystem mit einer massiven Produktion von Antikörpern. Dies ist ein generelles Problem der Gentherapie mit viralen Trägersystemen: die vom Immunsystem nach dem ersten Verabreichen der Viren gebildeten Antikörper würden bei einer wiederholten Gabe der Viren diese noch vor der Lieferung der Gene in die entsprechenden Zellen unschädlich machen. Eine wiederholte Virengabe ist jedoch notwendig, da die Transfektion meist nur transient ist.

Bei gentherapeutischen Versuchen wird oft mit abgeschwächten, d.h. nicht mehr vermehrungsfähigen, Viren gearbeitet. Diese tragen jedoch trotz veränderten Innenlebens dieselben Proteine auf ihrer Oberfläche. Diese Oberflächenproteine sind absolut notwendig, damit die Viren die therapeutischen Gene in die zu behandelnden Zellen transportieren können. Genau diese Oberflächenproteine werden aber auch durch das Immunsystem erkannt und veranlassen dieses zur Produktion von Antikörpern. Bereits kleine Veränderungen der Oberflächenproteine, die vorgenommen wurden, um die Immunogenität der Viren herabzusetzen, vermindern die Transfektionseffizienz oft massiv [31]. Daß Viren bei Experimenten mit Mäusen und Ratten, an denen sie vor dem Einsatz am Menschen erprobt werden, kaum zu einer Immunantwort führten, liegt v.a. daran, daß die eingesetzten Viren *humanpathogen* sind, bei Nagern jedoch keine Reaktion hervorrufen.

Die Immunabwehr auf virale Träger kann auch je nach Art der Applikation unterschiedlich stark ausfallen. So werden an der Uniklinik in Freiburg Studien für die gentherapeutische Behandlung von Eierstockkrebs mit Adenoviren durchgeführt. Diese werden dort jedoch nicht wie im Falle Gelsinger direkt in die Blutbahn verabreicht, sondern in den Bauchraum gespritzt. Dabei kam es bis jetzt noch nicht zu gefährlichen Immunreaktionen [3].

In der Gentherapie kommen viele Arten von Viren zum Einsatz, die alle besonders für die *in vitro* Therapie geeignet sind [32]. Hierzu zählen:

- Adenoviren sind eine sehr große Gruppe von Viren, die sich für eine *in vivo* Gentherapie, z.B. der Lunge, gut eignen, da sie bei Menschen verschiedene Atemwegserkrankungen wie z.B. grippale Infekte hervorrufen [33] [34]; solche Viren können daher als Aerosol appliziert werden. Weitere Vorteile sind eine hohe Übertragungseffizienz, der Transport großer Abschnitte an Fremd-DNS und die Infektion von ruhenden *und* proliferierenden Zellen. Die von ihnen transportierte DNS integriert nicht in die Chromosomen der Wirtszelle, so daß es nur zu einer transienten Wirkung kommt, wodurch eine mutagene Wirkung ausgeschlossen werden kann.
- AA-Viren [*adeno-assoziierte*] sind weit verbreitet und haben den Vorteil, daß sie einen Mechanismus besitzen, der zum Einbau der DNS in das humane Chromosom 19 führt, wodurch eine stabile Expression möglich ist. Auch solche Viren können ruhende Zellen infizieren, aufgrund der geringen Größe ihres Genoms jedoch nur Fremd-DNS bis ca. 4,5 kbp transportieren [35].
- HS-Viren [*Herpes simplex*] sind aufgrund ihres Rückzugs in das Nervensystem v.a. für ZNS – Krankheiten das System der Wahl. Das Hauptproblem beim Einsatz von Herpesviren ist ihre Immunogenität, da 90 % der Bevölkerung Träger von Herpes simplex – Viren sind und damit möglicherweise schon Antikörper gebildet haben [36].
- Lentiviren sind in der Lage, auch nicht bzw. sich nur langsam teilende Zellen zu transfizieren [37].
- Parvoviren sind mit nur etwa 25 nm Durchmesser die kleinsten Viren, die unter anderem am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg zur Krebstherapie eingesetzt werden [38].
- Retroviren sind – im Unterschied zu allen bislang genannten Viren – RNA-Viren, d.h. ihr Erbgut liegt in der Form von RNA vor; ihr bekanntester Vertreter ist HIV. Aus diesem Grund wird nach dem Befall einer Zelle mit einem Retrovirus die RNA mit Hilfe eines speziellen Enzyms, der Reversen Transkriptase, in virale DNS umgeschrieben und dann in dieser Form mittels des Enzyms Integrase dauerhaft in das Genom der Wirtszelle eingebaut [39]. Vorteile der Retroviren sind die hohe Übertragungseffizienz sowie die Möglichkeit, große Abschnitte an Fremd-DNS zu übertragen;

außerdem ist durch die feste Integration in das Wirtsgenom eine dauerhafte Expression der übertragenen Gene gewährleistet. Dem steht als Nachteil gegenüber, daß die Fremd-DNS an beliebigen Orten im Genom der Wirtszelle integriert wird, was zu Funktionsstörungen der DNS führen kann. Außerdem können Retroviren normalerweise nur Zellen infizieren, die sich gerade teilen, so daß beispielsweise Neuronen als Zielzellen damit nicht in Frage kommen. Wie HIV es schafft, auch Zellen zu infizieren, die sich nicht teilen, wird noch untersucht.

4.1.2.4 Nicht virale Methoden

Vor allem aufgrund der potentiellen Immunogenität von Viren und der sehr hohen Anforderungen der Zulassungsbehörden bezüglich der Zulassung von klinischen Studien zur Gentherapie, die sich aufgrund des oben erwähnten Falls Gelsinger noch verschärft haben, ist man in den letzten Jahren dazu übergegangen, intensiv nach den nichtviralen Trägern zu forschen.

Kombiniert man die DNS mit kationischen Polymeren wie Polyethylenimin [40] oder Polylysin [41], bilden diese Polymere mit DNS Komplexe. Diese werden als Polyplexe bezeichnet und haben sich in vitro und in klinischen Versuchen als vielversprechend erwiesen [42].

Die wichtigsten Vertreter der großen Gruppe der nicht viralen Systeme sind die kationischen Liposomen. Kombiniert man kationische Liposomen mit DNS, so nennt man die daraus entstandenen Komplexe Lipoplexe [43]. Liposomen bestehen – wie Zellmembranen auch – aus einer dünnen, etwa 4 nm umfassenden Doppelmembran von Phospholipiden; diese Doppelmembran umschließt einen wässrigen Innenraum.

Die für die Gentherapie eingesetzten Lipidvesikel bestehen in der Regel aus einer Mischung von neutralen und kationischen Lipiden. Als neutrale Lipide kommen vorwiegend DOPE (1,2-Dioleoyl-3-phosphatidylethanolamin), DOPC (1,2-Dioleoyl-3-phosphatidylcholin) oder Cholesterol zum Einsatz. Diese neutralen Lipide sind nicht nur Strukturbildner für die kationischen Liposomen, ihnen wird auch eine aktive Rolle bei der Aufnahme von Komplexen aus kationischen Liposomen und DNS in die Zelle zugeschrieben: sie sorgen für eine Fusion zwischen den Lipiden im DNS-Liposomen-Komplex und der Endosomenmembran, der dann eine Freisetzung der DNS ins Zellinnere folgt [44]. Ist die Anzahl der neutralen Helferlipide noch überschaubar, so ist die Vielfalt der eingesetzten Stoffe bei den kationischen Lipiden nahezu grenzenlos: Eine Möglichkeit, diese Lipide einzuteilen, besteht in der Anzahl der Ladungen, die sie pro Molekül tragen. Zu den einfach positiv geladenen Molekülen zählen z.B. das seit Ende der 80er Jahre untersuchte DOTAP (N-(1-(2,3-Dioleoyloxy-propyl)-N,N,N-trimethylammoniumpropan) [45], sowie das von Felgner eingeführte DOTMA (N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammoniumchlorid), das als 1:1 Kombination mit DOPE als Transfektionsreagenz unter dem Namen Lipofectin[®] erhältlich ist [46]. Ein weiteres

einfach positiv geladenes kationisches Lipid ist DDAB (Dimethyldioctadecylammoniumbromid) [47]. Bei den kationischen Lipiden, die pro Molekül mehrere positive Ladungen tragen, sind als Vertreter der zahlreichen mit Spermin kombinierten Lipiden DOGS (Dioctadecylamidoglycylspermin) [48] und DOSPA (2,3-Dioleoyloxy-N-[2(spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminiumtrifluoracetat zu nennen [49]. DOSPA wird als 3:1 – Gemisch mit DOPE als Lipofectamin® angeboten.

Neben Lipiden mit ein (z.B. CTAB [50]) bzw. zwei Alkylketten (z.B. DOTAP [45]) werden häufig auch positiv geladene Cholesterolderivate (z.B. DC-Chol) eingesetzt [51]. Aufgrund des meist natürlichen Ursprungs der eingesetzten Lipide entfällt das Problem der Immunreaktion bei der Verabreichung von mit DNS beladenen Lipoplexen.

Über die Struktur der Komplexe zwischen DNS und kationischen Liposomen gibt es sehr unterschiedliche Aussagen: So wurde von Gershon 1993 vorgeschlagen, daß die DNS im Inneren großer unilamellarer Liposomen eingeschlossen wird [52]. 1994 präsentierte Sternberg aggregierte Liposomen mit anhängenden Fäden von DNS, die sie als „Spaghetti/Fleischbällchen – Struktur“ beschrieben hat [53]. Koltover vertrat 1998 die Ansicht, daß die DNS in den wässrigen Zwischenräumen der invers hexagonalen Lipidphase eingeschlossen ist [54]. Weitere Beobachtungen stammen von Battersby aus dem Jahre 1998, der in die Diskussion brachte, daß Lipiddoppelschichten mit zwischengelagerten Monoschichten von DNS-Helices abwechseln [55]. Hübner entwickelte dieses Modell 1999 weiter und zeigte zum ersten Mal die Existenz von intakten Lipidvesikeln, an deren Außenseite DNS angelagert war [56].

Da die bei diesen Untersuchungen verwendeten Methoden sehr unterschiedlich waren, ließen sich damit komplett verschiedene Strukturen detektieren. Eine weitere mögliche Erklärung für die sehr vielfältigen Erscheinungsformen ist die unterschiedliche Probenpräparation, wie z.B. die Konzentration der verwendeten Reagenzien oder die unterschiedliche Reihenfolge der Mischung von DNS und kationischen Liposomen [57]. Meist wird die DNS bei solchen Komplexen von den Liposomen eingeschlossen, um sie vor dem Angriff von DNasen im Blut zu schützen [58]. Wenn Lipoplexe auf ihrer Außenseite positiv geladen sind, erhöht sich ihre Fähigkeit, mit der negativ geladenen Zellmembran zu wechselwirken [59]. Der genaue Mechanismus der Aufnahme von mit DNS beladenen Liposomen in Zellen ist nicht bekannt, zur Diskussion stehen u.a. eine Fusion der Liposomen mit der Zellmembran sowie die Möglichkeit der Endozytose [60] [61]. Durch ein Verschmelzen zwischen Lipoplex und Zellmembran kann die im Inneren des Liposoms befindliche DNS freigesetzt und in Richtung Zellkern bewegt werden.

Kationische Liposomen werden, wie virale Systeme auch, entweder mittels Spritze oder in Form eines Aerosols (z.B. zur Behandlung der Mukoviszidose) verabreicht.

Mit Lipoplexen lassen sich viel größere DNS-Stücke transportieren als mit Viren. In Tierexperimenten lässt sich – unter geeigneten Bedingungen – zwar eine vergleichbar starke Gen-Expression erreichen wie mit Viren; die Übertragung ist jedoch weitaus geringer. Während Viren ihre DNS z.T. mit fast 100 % Effizienz transfizieren, benötigt man für dieselbe Zahl an transfizierten Zellen etwa 10.000 Mal mehr DNS in Lipoplexen [62]. Der Einbau von Cholesterol in die Membran von Lipoplexen sowie die Verwendung von CMV-Promotern in DNS – Konstrukten können das Ausmaß der Expression auf das Niveau von Adenoviren erhöhen [63]. Um die Spezifität der Lipoplexe für bestimmte Zelltypen zu erhöhen, baut man bestimmte Proteine aus der Virushülle in die Lipoplexmembran ein. Weitere Proteine, die sich für den Einbau in die Membran eignen, sind sogenannte Membranfusionsproteine; diese erleichtern die Fusion der Lipoplexe mit der Zellmembran und die damit verbundene Freigabe der DNS in das Zellinnere. Eine weitere Möglichkeit ist die Verknüpfung von therapeutischen Genen mit speziellen viralen Proteinen, die dabei helfen, die Gene zum Zellkern zu dirigieren, damit dort die Information abgelesen und in Proteine übersetzt werden kann [64].

4.1.3 Gentherapie der Haut

4.1.3.1 Anatomie und Physiologie der Haut

Eine gute Übersicht über Anatomie und Physiologie der Haut findet sich bei Neubert [65]: Die Haut ist mit $1,5 - 2 \text{ m}^2$ und $7 - 10 \%$ des Gesamtkörpergewichts das größte Organ bei Erwachsenen. Sie ist eine der besten biologischen Barrieren, die in der Natur zu finden sind und schützt den Menschen gegen Chemikalien, Hitze, Kälte und Pathogene jeder Art (Bakterien, Pilze, Viren). Außerdem trägt die Haut entscheidend zur Aufrechterhaltung unseres Wasserhaushaltes bei, indem sie durch ihre Barrierefunktion die Austrocknung des Körpers verhindert. Gleichzeitig bietet sie dem Körper durch das Schwitzen die Möglichkeit, überschüssige Wärme abzuführen. Eine weitere Möglichkeit der Wasserabgabe über die Haut ist der sogenannte transepidermale Wasserverlust (TEWL), also nicht über die Schweißdrüsen. Der TEWL hängt u.a. von der Körperstelle und den Umgebungsbedingungen ab und liegt an den meisten Körperstellen in der Größenordnung von etwa $5 \text{ g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ [66]. Ferner übt die Haut durch die in ihr befindlichen Langerhans – Zellen wichtige Funktionen in der Immunabwehr aus.

Die Haut besteht – von außen nach innen – aus der Epidermis, der Dermis [Lederhaut] und der Subcutis [Unterhaut]. Die Epidermis selbst läßt sich unterteilen in – ebenfalls von außen nach innen – das 10 – 20 Zellschichten umfassende *Stratum corneum* [Hornschicht], das 2 – 3 zelllagige *Stratum granulosum* [Körnerschicht], das sich daran anschließende *Stratum spinosum* [Stachelzellschicht] mit 2 – 5 Schichten und schließlich das *Stratum basale* [Basalzellschicht], das die Grenze zwischen Epidermis und Dermis darstellt. Im Stratum basale, der tiefsten Epidermis-Schicht, finden Zellteilungen statt, wobei sich die aus dem *Stratum basale* abgegebenen Tochterzellen in Richtung *Stratum corneum* bewegen. Diese Wanderung sorgt dafür, daß sich die gesamte Epidermis alle 28 – 30 Tage erneuert, das *Stratum corneum* selbst etwa alle 14 Tage [67]. Dieser Zyklus ist bei bestimmten Hautkrankheiten wie der Psoriasis (Schuppenflechte) stark verkürzt, so daß sich die Haut nur unvollständig entwickelt, was insgesamt zu einer Störung der Barrierefunktion führt. Daher verliert die Haut von Psoriasis – Patienten weit mehr Wasser als bei Gesunden, wodurch sie sehr trocken ist und sich aufgrund des stark verkürzten Erneuerungszyklus ständig schuppt.

Die Dicke des Stratum corneum beträgt zwar weniger als 10 % der Gesamtdicke der Epidermis, aber es trägt zu mehr als 80 % der gesamten Permeabilitätsbarriere bei. Das Stratum corneum besteht aus flachen Stapeln sich überlappender, abgestorbener Korneozyten, die säulenartig angeordnet sind. Das Stratum corneum besteht aus ca. 10 – 20 Zellschichten voll keratinisierter Korneozyten, die überwiegend aus Keratinfilamenten aufgebaut sind, umgeben von einer dicht vernetzten, äußerst stabilen Hülle, dem „cornified envelope“. Es besteht im

Wesentlichen aus zwei Kompartimenten, den Korneozyten (verhornte Keratinozyten), und interkorneozytären, lamellären Lipidschichten [65]. Auf diese Art und Weise ist das Stratum corneum eine sehr effektive Barriere, so daß in der Literatur oft von der „Ziegelstein- und Mörtel-Struktur“ (engl. “brick and mortar model”) der Haut gesprochen wird [68].

Um die Hautbarriere zu überwinden und damit nackte DNS verabreichen zu können, könnte das Verfahren des sog. „Tape Strippings“ angewendet werden, bei dem durch das Aufkleben von Tesafilm auf die Haut und anschließendes Wieder-Abreißen des Tesafilms die einzelnen Hautschichten abgetragen werden können [69]. Dieses Verfahren ist für die menschliche Haut jedoch kaum geeignet, da es sehr viele Zyklen erfordert. Außerdem führt die durch das ständige Abreißen hervorgerufene Entzündung leicht zu einer Verfälschung der Meßergebnisse. Eine andere Möglichkeit ist die Okklusion, also ein luftdichtes Abschließen der Haut. Hält die Okklusion über einen Zeitraum von mehr als 24 Stunden an, sinkt die Barriereeigenschaft des Stratum corneums stark [70]. Der Einsatz von Lösungsmitteln wie Chloroform oder Aceton bzw. von Detergentien macht die Haut ebenfalls durchlässiger; weitere Verfahren zur Überwindung der Hautbarriere sind die Iontophorese und die Elektroporation, bei der elektrische Spannungen angelegt werden, die zu einer Bildung von Poren durch die Haut führen.

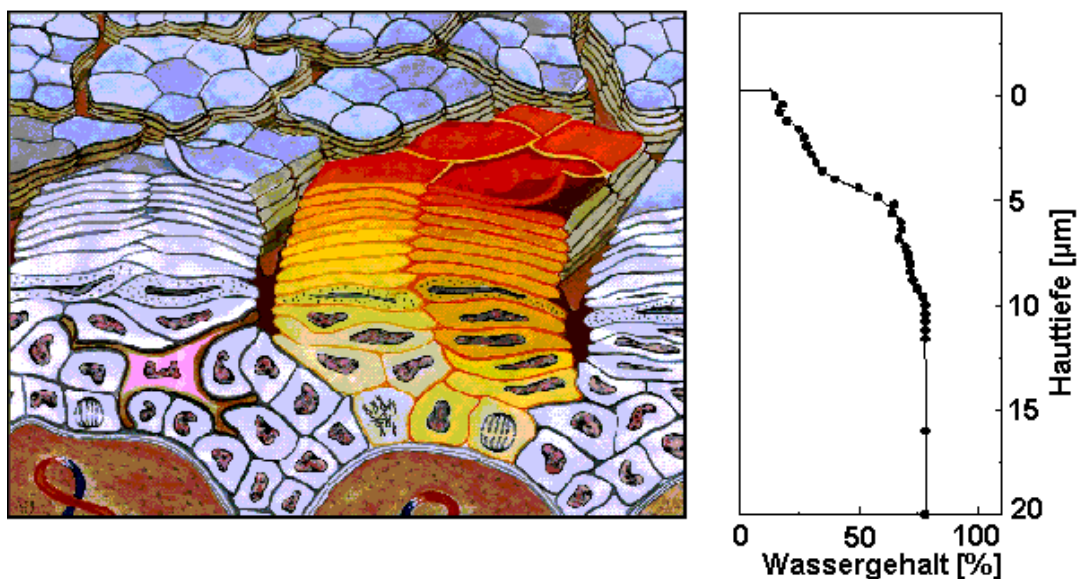


Abbildung 3: Querschnitt der Epidermis mit Verteilung des Wassergradienten (nach [71])

Die durchschnittliche Anzahl der Lipidlamellen und deren Ordnungsgrad nimmt in Richtung Hautoberfläche zu, was mit dem kontinuierlichen, nicht linearen Abfall des Wassergehaltes in derselben Richtung korreliert. Trotzdem ist die hauptsächliche Hautbarriere in der inneren Hälfte der Hornschicht zu finden, im sogenannten Stratum corneum conjunctum, wo die zwischenzellulären Lipidversiegelungen bereits geformt, aber noch nicht – wie im äußeren Teil, dem Stratum corneum disjunctum – durch die Abschilferung der toten Hautzellen beeinträchtigt sind.

4.1.3.2 Gentherapie der Haut

Die Haut als Organ für die Gentherapie zu verwenden, ist ein relativ neuer Ansatz mit großem Potential. Daß die Haut ein besonders geeignetes Organ für die Gentherapie ist, hat verschiedene Gründe [18] [72]:

Die Haut ist leicht zugänglich und die behandelte Fläche leicht zu beobachten, was gerade für eine topische Behandlung von Hautkrebsarten wie dem Basalzellkarzinom von entscheidender Bedeutung ist [73]. Von den gentherapeutisch behandelten Stellen lassen sich leicht Biopsien machen, um den Therapieerfolg zu überprüfen. Systemisch betrachtet ist die Haut – neben dem Darm – das Hauptorgan der Immunabwehr, was v.a. den Langerhans-Zellen zuzuschreiben ist (s.a. 4.1.3.1). Außerdem weist die Haut als Bioreaktor ausgeprägte Synthesefunktionen auf [74] und falls die Produktion des Genproduktes nicht (mehr) erwünscht ist, läßt sich die behandelte Stelle leicht wieder chirurgisch entfernen. Nicht zuletzt weist eine transdermale Applikation von Wirkstoffen eine verbesserte Akzeptanz durch den Patienten auf, da sie nicht invasiv und schmerzlos ist.

Einen guten Überblick über die Gentherapie der Haut bietet Hengge [75]:

Prinzipiell erfolgt die Verabreichung der DNS mit denselben physikalischen und chemischen Verfahren wie bei der Gentherapie anderer Organe, z.B. mittels Elektroporation oder gene gun bzw. mit Hilfe von Polyplexen oder Lipoplexen; auch die Herausforderungen bzgl. Immunogenität und Zellspezifität sind im Wesentlichen dieselben. Ein auf die Haarfollikel gerichteter Transport der DNS wäre z.B. mit Hilfe von adeno-assoziierten Viren möglich [76].

Gelingt es, DNS über die Haut bis in Stammzellen der Haut zu transportieren, die jedoch nur einen Bruchteil der Basalzellschicht darstellt, so erhält man dadurch die Möglichkeit, Erbkrankheiten wie die Blasensucht [77] [78] und die Fischeschuppenkrankheit (Lamellare Ichthyosis) [79] ursächlich zu heilen. Dann ließe sich die Haut als permanenter Bioreaktor nutzen, da alle anderen transfizierten Zellen aufgrund der Erneuerung der Epidermis irgendwann absterben.

Ein weites Feld tut sich auch im Bereich der Wundheilung auf, z.B. nach großflächigen Verbrennungen. Hierbei könnte der Transfer und die Expression von DNS, die für Wachstumsfaktoren wie EGF oder PDGF codiert, dafür sorgen, daß nicht oder nur sehr schlecht heilende Wunden beschleunigt heilen [80]. Die dabei verwendeten Zellen, auf die sich die Gentherapie erstreckt, sind vorwiegend Keratinozyten und Fibroblasten.

Folgende Möglichkeiten der gentherapeutischen Behandlung der Haut sind vorstellbar/ werden schon durchgeführt:

- Behandlung von Erbkrankheiten der Haut wie die bereits erwähnte Blasensucht und die Fischeschuppenkrankheit. Durch die Züchtung von transgenen Mäuse hat man geeignete

Tiermodelle und kann an diesen den Effekt gentherapeutischer Verfahren zur Heilung dieser Erbkrankheiten testen.

- Behandlung des schwarzen Hautkrebses (= *Melanom*) mittels chirurgischer Maßnahmen, die mit der direkten Injektion von DNS kombiniert werden können [81].
- Immunisierung gegen Allergien (z.B. Heuschnupfen) bzw. Grippe [82] durch die Haut (Vorteile: keine Integration und keine Replikation, keine Vektor-Nebenwirkungen).
- Impfungen durch Verabreichen einer geeigneten DNS-Vakzine auf die Haut [83] [84]. Im Rahmen von Vakzinierungsstudien stellte sich heraus, daß die Applikation des Impfstoffes mittels Gene-Gun eine ausgewogene TH₁/TH₂ – Antwort hervorruft [23].
- Nutzung der Haut als „Bioreaktor“, z.B. für die Produktion von hGH [85], Faktor IX [86] und/ oder diverser Interleukine sowie Erythropoietin [87].

4.2 Flexible Lipidvesikel

4.2.1 Zusammensetzung

Flexible Lipidvesikel sind spezielle Lipidaggregate. Sie sind biokompatible, hoch deformierbare Wirkstoffträger, die dahingehend optimiert wurden, daß sie extrem flexible Membranen haben.

Hauptbestandteil der flexiblen Vesikel sind (Phospho)Lipide: Gibt man diese in Wasser, ordnen sie sich selbständig in Form ein- bzw. mehrschaliger Vesikel an, die auch als Liposomen bezeichnet werden. Diese Liposomen bestehen aus einer ca. 4 nm dicken Doppelmembran, die einen wässrigen Innenraum umschließt. Phospholipide nehmen diese räumliche Struktur an, da ihr hydrophiler Kopf nur geringfügig größer ist als ihre hydrophoben Schwänze.

Gibt man eine ausreichende Menge Tenside in Wasser, so ordnen sich diese ab einer bestimmten Konzentration – ebenfalls selbstständig – in Form von Mizellen an. Das liegt daran, daß bei Tensiden der hydrophile Kopf einen deutlich größeren Raumbedarf hat als der hydrophobe Schwanz.

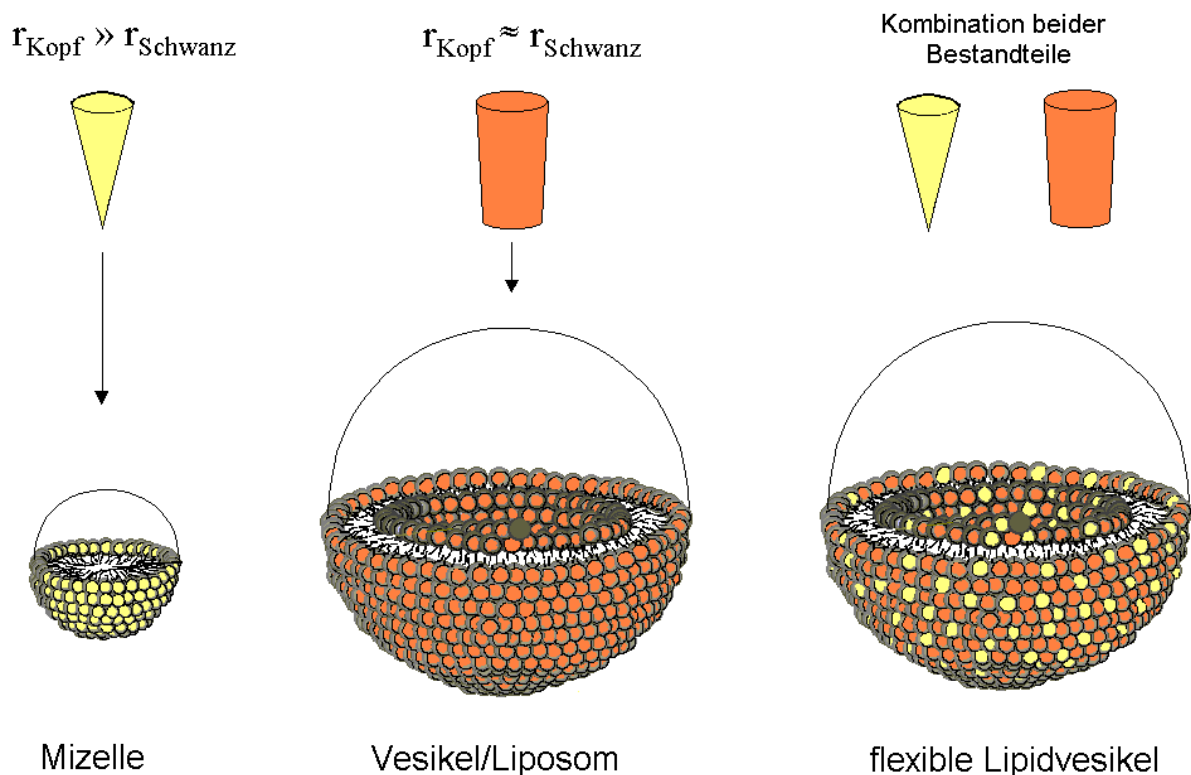


Abbildung 4: Mizellen, Liposomen und flexible Lipidvesikel im Vergleich

Flexible Vesikel sind – wie Liposomen auch – Lipidvesikel mit einer Lipid-Doppelschicht, die einen wässrigen Innenraum umgibt. Sie sind in einer wässrigen Grundlage suspendiert

und stellen meist ein Gemisch aus einem Phospholipid und einem Tensid dar. Ein Hauptbestandteil der flexiblen Lipidvesikel ist meist das Phospholipid SPC (Sojaphosphatidylcholin), der andere oft ein nichtionisches (z.B. Polysorbat) oder anionisches (z.B. Natriumcholat) Tensid. Phospholipid und Tensid, die beiden Bestandteile der Vesikel, unterscheiden sich durch ihre Löslichkeit in Wasser und in ihrer Molekülform (s. Abbildung 4).

Die Eigenschaften der flexiblen Lipidvesikel werden außer von den im folgenden Kapitel beschriebenen Faktoren v.a. von der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) der verwendeten Bestandteile beeinflusst. (Grund: s. Kapitel 5.4).

Phospholipide

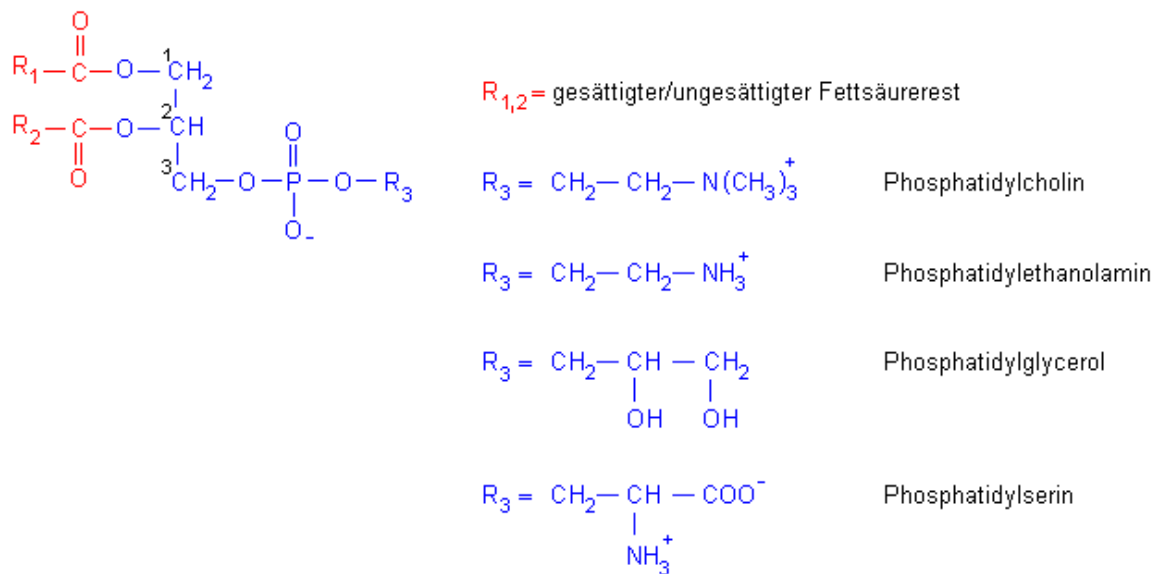


Abbildung 5: Strukturformeln einiger Phospholipide

4.2.2 Funktionsweise der flexiblen Lipidvesikel

Der prinzipielle Unterschied zwischen flexiblen Lipidvesikeln und Liposomen ist, daß bei den flexiblen Lipidvesikeln die Membran kontrolliert destabilisiert ist, während sie bei Liposomen stabilisiert ist. Die membrandestabilisierende Komponente sorgt durch ihre Molekülgeometrie dafür, daß die Lipid-Doppelschicht der Vesikel viel anpassungsfähiger wird als eine Liposomenmembran. Daher können flexible Vesikel ihre Form leicht dem lokalen Umgebungsstreß anpassen. Sie können aufgrund ihrer Flexibilität mikroporöse Barrieren sehr effizient überqueren, sogar dann, wenn die zur Verfügung stehenden Öffnungen viel enger sind als die durchschnittliche Größe der flexiblen Lipidvesikel. Einen Aufschluß über die Flexibilität der Vesikel gibt der sogenannte Penetration Assay (s. 5.10).

Die flexiblen Lipidvesikel können ebenso wie Liposomen Wirkstoffe binden und diese anschließend verzögert freisetzen. Aufgrund ihrer Membranflexibilität können sie außerdem einen Materialtransport durch Barrieren wie Haut oder Schleimhaut vermitteln [88].

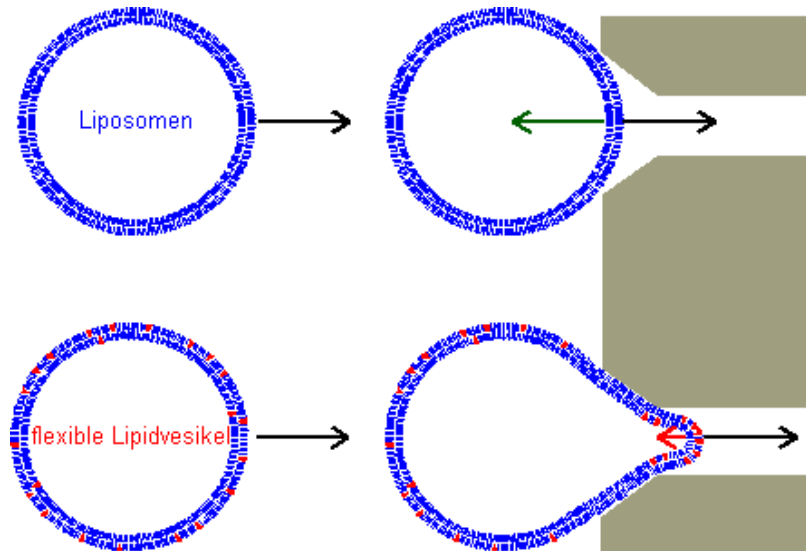


Abbildung 6: Unterschiede zwischen Liposomen und flexiblen Lipidvesikeln

Trägt man eine Formulierung aus flexiblen Vesikeln auf die Haut auf und lässt sie dort partiell austrocknen, so verdunstet das Wasser von der relativ trockenen Hautoberfläche. Dem Vesikel wird somit Wasser entzogen. Überschreitet die Konzentration der auf die Haut aufgetragenen Vesikelsuspension einen bestimmten Wert, so erfahren die Vesikel eine dramatische Formveränderung, ohne dabei ihre Integrität zu verlieren. Durch diese Formveränderung gelingt es ihnen, vorübergehend die nur wenige Nanometer breiten Hautkanälchen zu öffnen, durch die normalerweise das Wasser verdunstet [89]. Entlang der von ihnen geöffneten Hautkanälchen erreichen die flexiblen Vesikel dann Bereiche hohen Wassergehalts in den tieferen Schichten. Dort reorganisieren sich die Vesikel und nehmen wieder ihre ursprüngliche Form an. Die flexiblen Lipidvesikel sind zu groß, um lokal in die Blutgefäße zu gelangen. Die Träger kommen deshalb nicht auf direktem Wege in die Kapillaren der systemischen Blutzirkulation kommen, sondern über das lymphatische System [88].

Während der Hautpassage werden die Hautkanälchen durch die flexiblen Vesikel nur vorübergehend geöffnet, so daß die Barriere des Stratum corneums nicht beeinträchtigt wird. Darin unterscheidet sich die Wirkstoffverabreichung mittels flexibler Lipidvesikel vom invasiven Verfahren der iontophoretischen Verabreichung von Stoffen durch die Haut, aber auch von herkömmlichen TTS (*Transdermalen Therapeutischen Systemen*). Die TTS sorgen teils durch Okklusionseffekte, teils durch den Zusatz von Penetrationsverstärkern wie Ethanol oder DMSO dafür, daß die Barrierefunktion des Stratum corneums vorübergehend beeinträchtigt

wird. Der Okklusionseffekt ermöglicht zahlreichen niedermolekularen Substanzen den Durchtritt durch die Haut. Bei der Iontophorese wird die Barrierefunktion sogar kurzzeitig zerstört.

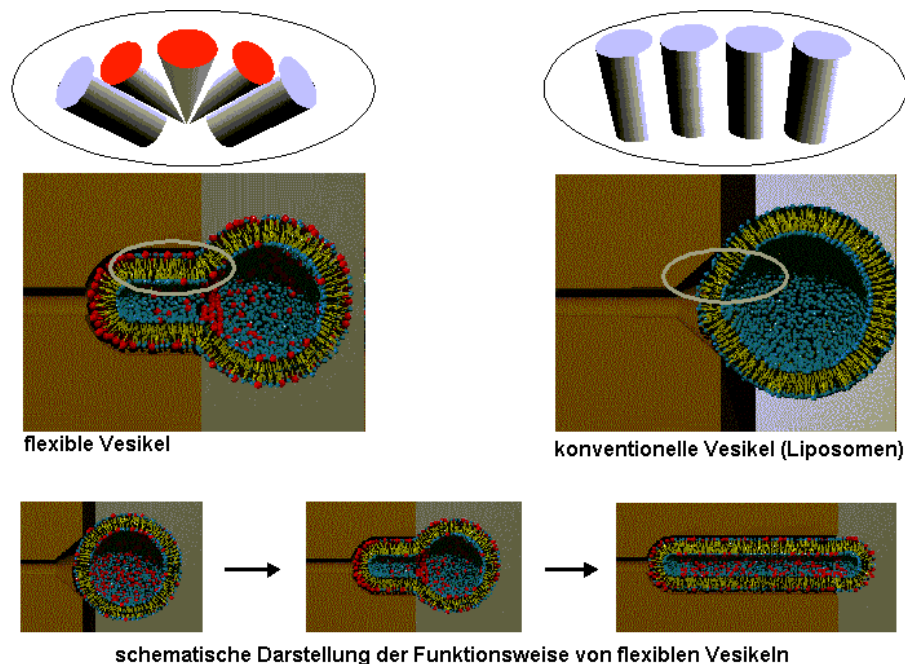


Abbildung 7: Funktionsweise der Penetration von flexiblen Vesikeln

Die Penetrationsfähigkeit von flexiblen Vesikeln kann zum nichtinvasiven Transport von Wirkstoffen durch die Haut genutzt werden. Dabei wurde bislang sowohl für niedermolekulare Substanzen wie Analgetika [90], als auch für höhermolekulare Stoffe wie Peptide oder gar Proteine [91] [92] [93] gezeigt, daß der Transport dieser Stoffe durch die Haut mittels flexibler Vesikel möglich ist. Die Molekülgröße der zu transportierenden Stoffe ist also nicht entscheidend. Wichtig ist nur, daß diese Wirkstoffe entweder von den Trägern eingeschlossen werden oder mit der Außenseite der flexiblen Vesikeln wechselwirken müssen, um mit deren Hilfe transportiert zu werden. Die Anpassungsfähigkeit der flexiblen Vesikel darf dadurch jedoch nicht allzu stark beeinflußt werden. Bei der Assoziation der Wirkstoffe können z.B. van-der-Waals-Kräfte oder elektrostatische Wechselwirkungen mit den flexiblen Vesikeln eine Rolle spielen. Bei niedermolekularen Substanzen ist – bei geeigneter Molekülgeometrie und dem Vorliegen von amphiphilen Stoffen – sogar eine Einlagerung in die Membran möglich. All die genannten Kräfte werden von vielen Parametern, z.B. pH-Wert, Ionenstärke oder Dielektrizitätskonstante beeinflußt. Dadurch läßt sich die Stärke der Bindung, aber auch die Freisetzung von Wirkstoffen gezielt beeinflussen und an die für den jeweiligen Einzelfall notwendigen Erfordernisse anpassen.

4.3 DNS

4.3.1 Aufbau

Nukleinsäuren sind Makromoleküle, die genetische Informationen speichern und weitergeben. Bei der Zellteilung durch Replikation wird DNS unverändert weitergegeben; durch Transkription und Translation wird sie mittels RNA in Proteine „übersetzt“. Beim Menschen codieren nur etwa 3 % der gesamten DNS für Proteine. Wozu die restliche DNS dient, ist noch nicht vollständig bekannt, wahrscheinlich enthält aber auch dieser Rest wichtige Informationen, z.B. über die Regulation der Genexpression.

DNS besteht aus linearen Polymeren von Nukleotiden; diese enthalten eine Stickstoff-Base, eine Pentose und Phosphorsäure im Molekül. Als Stickstoff-Basen kommen die beiden Purine Adenin [A] und Guanin [G] sowie die zwei Pyrimidine Cytosin [C] und Thymin [T] vor; bei RNA ist statt Thymin Uracil [U] enthalten. Die Zuckergruppe ist in RNA die Ribose und in DNS die stabilere Desoxyribose. Verbunden sind die Nukleotide durch Phosphodiesterbrücken, die die 3' und 5'-Positionen aufeinanderfolgender Zucker-Reste verbinden. Diese Polynukleotidphosphate sind sauer, so daß Nukleinsäuren bei physiologischem pH-Wert als Polyanionen vorliegen.

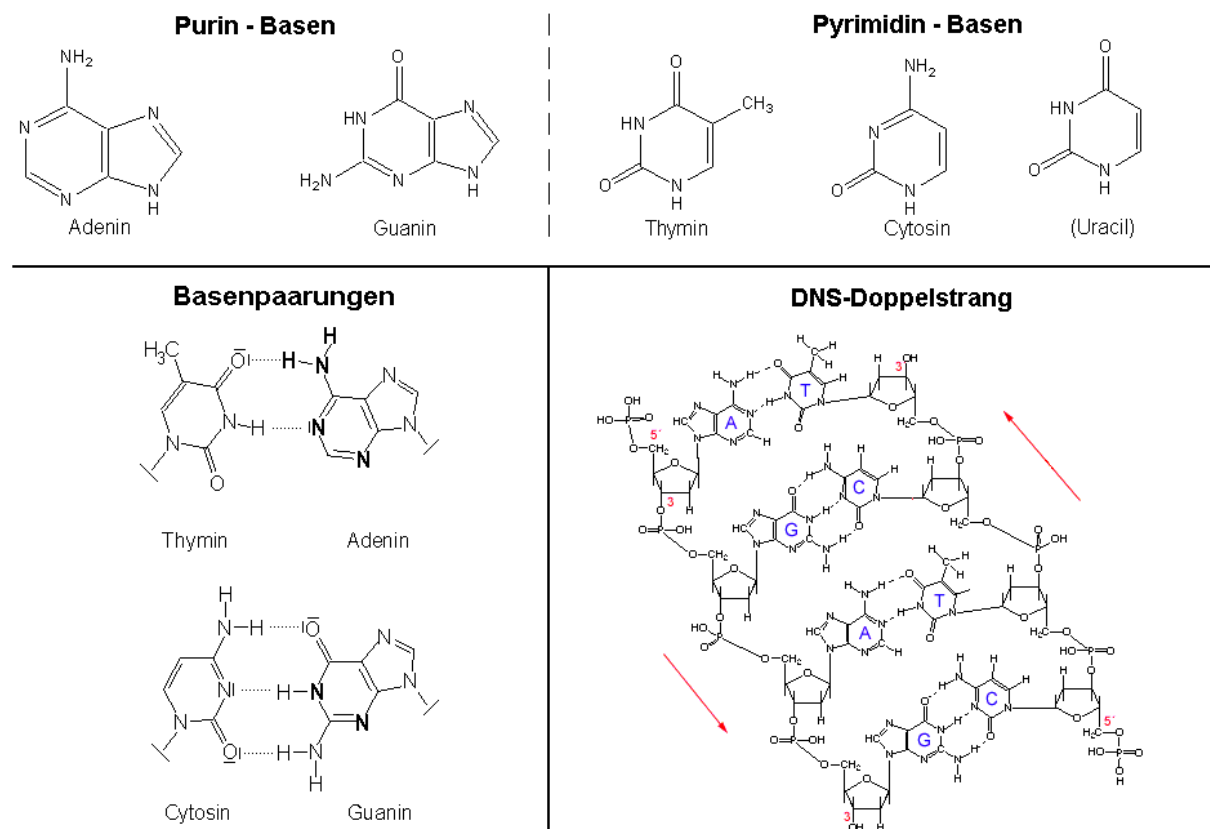


Abbildung 8: DNS (Purin- und Pyrimidin-Basen, Basenpaarungen, DNS-Doppelstrang)

Die Primärstruktur der DNS ist die Abfolge der Basen, wobei jeweils drei aufeinanderfolgende Basen für eine bestimmte Aminosäure codieren. Bei $4^3 = 64$ Kombinationen gibt es ausreichend Möglichkeiten, daraus die etwa 20 vorkommenden Aminosäuren herzustellen.

Die Sekundärstruktur beschreibt die Struktur des gesamten DNS-Moleküls. Das lineare Polymer liegt normalerweise in Form einer Doppelhelix vor. In diesem DNS-Doppelstrang liegen sich immer Adenin- und Thymin-Reste – verbunden durch zwei Wasserstoffbrücken – gegenüber sowie die durch drei Wasserstoffbrücken verbundenen Guanin- und Cytosin-Reste. Aufgrund der unterschiedlichen Gehalte der vier Basen A, C, G, T in verschiedenen DNS-Strängen unterscheiden sich diese in ihren physikalischen Eigenschaften, z.B. Denaturierungstemperatur, beträchtlich.

An der Außenseite dieser „helikalen Treppe“ gibt es eine große und eine kleine Furche. Diese bilden eine Art Treppenwindung. Die Anzahl der Basenpaare pro Treppenwindung ergibt – multipliziert mit der helikalen Windung pro Basenpaar – die Höhe einer Treppenwindung. Außerdem läßt sich die Sekundärstruktur noch über die Neigung einer Base zur Helixachse charakterisieren sowie die Beschreibung der Form der großen und kleinen Furche. Für die wichtigsten DNS-Formen sind diese Eigenschaften in Tabelle 1 aufgeführt:




Eigenschaft	A – Form	B – Form	Z – Form
helikaler Drehsinn	rechtsgängig	rechtsgängig	linksgängig
Durchmesser	~ 2,6 nm	~ 2 nm	~1,8 nm
Basenpaare pro helikaler Windung	11	10	12
helikale Windung pro Basenpaar	33 °	36 °	30 °
helikale Ganghöhe, d.h. Anstieg pro Windung	2,8 nm	3,4 nm	4,5 nm
helikaler Anstieg pro Basenpaar	0,26 nm	0,34 nm	0,37 nm
normale Basenneigung zur Helixachse	20 °	6 °	7 °
große Furche	eng + tief	breit + tief	flach
kleine Furche	breit + flach	eng + tief	eng + tief
schematische Darstellung			
	A-DNA	B-DNA	Z-DNA

Tabelle 1: Strukturelle Eigenschaften idealer A, B und Z-DNS (nach [94])

In wässrigen Lösungen sowie unter *in vivo* Bedingungen liegt DNS in Form der B-Helix vor. Bei höheren Ionenstärken und Feuchtigkeiten um 75 % findet eine reversible Konformationsänderung der DNS in die sogenannte A-Struktur statt [95]. Diese Änderung ist biochemisch nicht relevant, könnte aber bei der Komplexierung kationischer Lipide mit der DNS eine Rolle spielen. Die starken elektrostatischen Wechselwirkungen könnten nämlich zu einer Dehydratation und damit zu Konformationsänderungen führen. Auch ein Übergang der B-Form in eine sogenannte C-Form bei hohen Salzkonzentrationen bzw. in nicht wässrigen Lösungsmitteln wie Ethylenglykol wurde beobachtet [96].

Im Rahmen dieser Arbeit könnten derartige Veränderungen dadurch auftreten, daß es beim Auftragen von mit DNS beladenen flexiblen Vesikeln bei den *in vivo* Experimenten zu einem Eintrocknen der Träger auf der Haut kommt, wodurch der Wassergehalt der Formulierungen abnimmt.

Die linksgängige Z-Form hat ihren Namen von ihrer Zickzack-Form, die die Zucker-Phosphatkette beschreibt. Sie tritt bei hohen Salzkonzentrationen auf, wenn als Wiederholungseinheit ein Dinukleotid mit alternierenden Pyrimidin- und Purinresten vorliegt und nicht – wie in der A- und B-Form – ein einzelnes Nukleotid; ihre räumliche Anordnung erinnert an die linksgängige Spitze eines Bohrers [97].

Die Tertiärstruktur unterscheidet zwischen linearen und zyklischen Formen der DNS. Zyklische Formen können eine knäuelartige Form annehmen. Die überwiegende Mehrheit der extrachromosomalen DNS in lebenden Zellen liegt in zirkulärer Form vor, einige Viren haben jedoch lineare Plasmide.

4.3.2 Physikochemische Eigenschaften

In wässriger Umgebung liegt die DNS in linearer, kreisartiger oder knäuelartiger Form vor. DNS-Moleküle sind in einfacher wässriger Lösung chemisch recht stabil. Plasmide < 15 MDa sind robust und brechen bei den in der Gentherapie angewendeten Bedingungen nicht [98]. Systemisch injizierte DNS sowie extrazelluläre DNS wird jedoch durch die im Blut vorhandenen DNasen schnell gespalten.

Um die thermodynamischen Eigenschaften der DNS zu erklären, wurden verschiedene Polymer- und Polyelektrolyt-Theorien sowie Computersimulationen vorgeschlagen. Wegen ihrer kompletten Ionisierung bei physiologischen pH-Werten ist die DNS ein halbstarres, stabförmiges Polymer, da durch diese Anordnung die Ladungstrennung am besten stabilisiert wird. Die Persistenzlänge der DNS, ein Maß für die Steifheit eines Polymers, beträgt bei niedriger Ionenstärke etwa 50 – 70 nm, bei höheren Ionenstärken etwa 35 nm [99].

Während man anfangs noch davon ausging, daß Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren die vorherrschenden Wechselwirkungen sind, die die Struktur der DNS bestimmen, ist man mittlerweile der Meinung, daß die hydrophoben Kräfte zwischen den Basenpaaren und die Hydratationskraft noch wichtiger sind. Durch ihren Charakter als Polyelektrolyt enthält jedes Nukleotid mindestens 9 – 10 Wassermoleküle in seiner Hydrathülle. Gegenionen bilden eine ionische Atmosphäre um die negativ geladene DNS herum. Kleine Moleküle wechselwirken mit der DNS entweder elektrostatisch, durch hydrophobe Interaktion, Wasserstoffbrücken oder sterische Kräfte.

Wechselwirkungen zwischen kationischen Detergentien und DNS werden seit den frühen 60er Jahren untersucht. Mischungen aus DNS und gegensätzlich geladenen Mizellen zeigen Löslichkeitslücken bei bestimmten Ladungsverhältnissen. Üblicherweise findet man die größten Effekte bei ausgeglichener Ladung [99]. Aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung von DNS und positiv geladenen Strukturen besteht keine große Wechselwirkung zwischen DNS und nichtionischen bzw. neutralen Liposomen. Unmittelbar nach dem Mischen tritt daher auch keine Trübung oder Änderung der Partikelgröße auf. Die Zugabe von Metallionen oder kationischen Polyelektrolyten führt bei anionischen Liposomen zu drastischen Veränderungen. Solche Ionen wirken als Bindeglied zwischen der negativen DNS und den negativ geladenen Liposomen.

Im Rahmen dieser Arbeit spielt das Ladungsverhältnis von kationischem Lipid in den Trägern zur DNS eine große Rolle. Daher soll an dieser Stelle exemplarisch die Ladung der DNS berechnet werden:

Nach [100] kann die DNS als Kette äquidistanter negativer Ladungen angesehen werden, wobei sich im Fall der vollständig ionisierten DNS, also im wässrigen Milieu, 76 % der Gegenionen (z.B. Na^+) an die DNS anlagern. Nimmt man nun vereinfachend an, daß diese auch bei der Anwesenheit von kationischen Lipidvesikeln vorhanden sind, bleiben zur Wechselwirkung mit kationischen Lipiden noch 24 % der Ladungen übrig. Bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 660 g/mol für ein Basenpaar (= 2 Ladungen) ergibt sich für die Ladungsschicht pro mg DNS:

$$n_{\text{DNS}} \cdot N_A \cdot 2 \cdot 0,24 = (m_{\text{DNS}}/M_{\text{bp}}) \cdot N_A \cdot 0,48 = (10^{-3} \text{ g} / [660 \text{ g/mol}]) \cdot 6,023 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} \cdot 0,48$$

Demnach trägt ein Milligramm DNS etwa $4,4 \cdot 10^{17}$ einfach negative Ladungen.

4.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, Formulierungen zu entwickeln, die in der Lage sind, genetisches Material transdermal zu verabreichen. Die grundsätzliche Möglichkeit von flexiblen Lipidvesikeln, Makromoleküle zu binden und mit diesen zusammen die Hautbarriere zu überwinden, wirft die Frage auf, ob solche Vesikel auch für einen Transport von DNS geeignet sind. Wenn ja, wäre eine einfache, nicht-invasive, schmerzfreie sowie kostensparende Alternative zur Injektion denkbar, die eine gezielte gentherapeutische Behandlung von Hauterkrankungen oder eine transdermale DNS – Vakzinierung ermöglicht. Die Anwendung der mit DNS beladenen flexiblen Lipidvesikel könnte dann durch einfache dermale Applikation erfolgen.

Der Transport von Makromolekülen mittels flexibler Vesikel wurde in der Literatur bereits detailliert beschrieben. Die Situation bei der Verwendung von DNS als Wirkstoff ist jedoch um einiges schwieriger, da DNS ein sehr hohes Molekulargewicht aufweist und als Polyelektrolyt stark negativ geladen ist. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die gebundene DNS die Flexibilität der Trägermembran beeinträchtigen könnte. Bei den meisten in der Literatur zu findenden Formulierungen ist die DNS in die Liposomen eingeschlossen, um die DNS nach systemischer Verabreichung vor dem Angriff der sie abbauenden Enzyme im Blut zu schützen. Eine Formulierung aus flexiblen Vesikeln und DNS sollte die DNS auf ihrer *Außenseite* tragen, da zu befürchten war, daß die Verformbarkeit der Träger stark herabgesetzt wird, wenn sich die raumbeanspruchende DNS im wässrigen Innenraum der Vesikel aufhält.

Folgende Punkte wurden im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet:

- Entwicklung, Herstellung und Charakterisierung verschiedener kationischer flexibler Vesikel
- Entwicklung einer Methode zur Zerkleinerung genomischer DNS zur Gewinnung von DNS im Milligrammbereich
- Untersuchung der physikochemischen Eigenschaften von verschiedenen mit DNS beladenen flexiblen Vesikel (CMC-Bestimmung, Mischkinetik, Größe, Deformierbarkeit der mit DNS beladenen Träger)
- Entwicklung analytischer Methoden zur Quantifizierung aller Bestandteile der mit DNS beladenen flexiblen Vesikel (SPC, CTAB, Polysorbat, DC-Chol, DNS)
- *In vitro* Zellkultur-Experimente mit einer DNS-Vesikel – Formulierung, um die Transfektionsfähigkeit der DNS-Vesikel zu testen
- *In vivo* Experimente an Mäusen sowie anschließende CLSM – Untersuchung der Schnitte, um Aufschluß darüber zu erhalten, wo Vesikel und DNS in der Haut lokalisiert sind

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage AG RC-210D-ODI	Sartorius
Bechergläser 10 ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml	Schott
Biopsiestanzen Ø 3 mm	Stiefel
Computerprogramme Word, Excel/ Origin	Microsoft/ Microcal
CLSM – Mikroskop LSM 510	Zeiss
Deckgläschen für Mikroskopie	Brand
Einmalspritzen 2 ml	Braun Melsungen
Elektrorasierer „Lady Braun Style Universal“	Braun
Eppendorf – Gefäße (0,5 ml und 1,5 ml)	Eppendorf
Filterkerze 20 ml (SM 16223)	Sartorius
Filterkerze 200 ml (SM 16249)	Sartorius
Fluorimeter Model LS-3B	Perkin-Elmer Limited
Fluoreszenzmikroskop Axioskop mit Quecksilberdampf Lampe HBO 50	Carl Zeiss GmbH
Gelelektrophorese kammer	Biorad
Glasschale (Durchmesser ca. 20 cm)	Schott
Glasperlen	Roth
Hamiltonspritze (Modell Microliter # 725)	Hamilton, Bonaduz (CH)
Handextruder	Avestin
Heizbad WB 2200	Heidolph
Laminar Air Flow Bank	Tecnoflow
Kanülen (1,2x40 mm, 0,9x40 mm, 0,4x19 mm)	Braun Melsungen
Magnetrührer (Modell Rhbasic)	IKA Labortechnik
Rührer (für pH-Meter) Typ pH Mix 540	WTW
Meßkolben (20 ml, 100 ml, 1000 ml)	Schott
Objektträger	Menzel
pH-Elektrode InLab 422	Mettler Toledo

Gerät	Hersteller
pH-Meter (pH 540 GLP)	WTW
Photonenkorrelationsspektrometer ALV-5000 (Modell 1137 P)	ALV (Laservertriebsgesellschaft Langen)
Phototrode DP 550	Mettler Toledo
Titration DL 67	Mettler Toledo
Transferpettor + Spitzen	Brand
Pipetten (10 µl, 50 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf
Polycarbonatmembranfilter	Infiltec
Präzisionsküvetten (Quarzglas)	Hellma
Präzisionswaage LP 5200 P	Sartorius
Rotationsverdampfer V 2000	Heidolph
Stickstoffflasche	Tescom
Ultraschallbad (Typ T480/H-2)	Elma
Ultraschallspitze	Braun Melsungen
UV-Lampe für die Gelelektrophorese	Desaga
UV-Spektrometer UV-1601	Shimadzu Corporation
Vakuumpumpe (Typ RZ 5)	Vacuubrand
Vortexer	Bender & Hobein

5.2 Material

Chemikalie (p.a. Qualität)	Hersteller
Acetanhydrid	Sigma
Agarose	Fluka
Aqua ad injectabilia	Delta Infusionen
Borsäure	Merck
Bromphenolblau-Na	Serva
CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)	Fluka
Cy 5 [®]	Mirus
DC-Chol (3-β-(N-(N',N'-dimethyl-amino-ethan)carbonyl)Cholesterol)	Bachem
Dichlormethan	Fluka
DNS (Kalbsthymus-DNS)	Sigma
DNS-Längenstandard II	Boehringer Mannheim
DPH (1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien)	Sigma
Ethanol (99 %)	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Glycerol	Fluka
Isopropanol	Riedel de Haen
MEM – Puffer	Biochrom
Methanol	Baker
Na ₂ EDTA	Serva
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	Synopharm
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	Synopharm
Natronlauge 30 %	Merck
PNA (N-Phenyl-Naphtylamin)	Aldrich
Plasmid-DNS für GFP, CFP und red-FP	Clontech
Polysorbat 80	Synopharm
Rhodamin-DHPE	Molecular Probes
Salzsäure 1 M	Riedel-de-Haen
Schwefelsäure (konzentrierte)	Sigma
Soja-Phosphatidylcholin	Nattermann (Phospholipon 90G/100G) bzw. Lipoid (Lipoid S 100)
THF (Tetrahydrofuran)	Merck
TRIS (Trishydroxymethylaminomethan)	Fluka

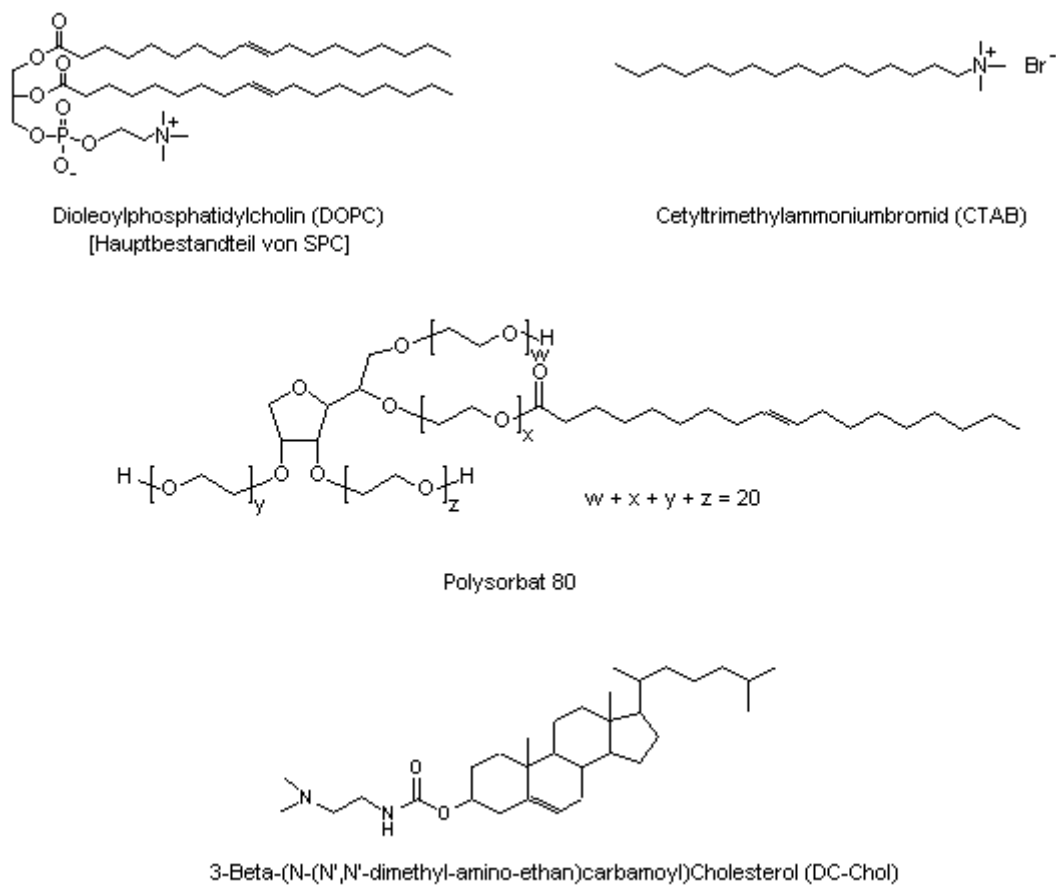


Abbildung 9: Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Vesikel-Bestandteile

5.3 Verwendete Lösungen und Suspensionen

Phosphatpuffer pH 6,5 (Grundlage für alle Suspensionen und DNS – Lösungen)

Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	5,677 g
NaHPO ₄ · 2 H ₂ O	5,329 g
Aqua ad injectabilia	ad 1,00 L

Kritische Mizellbildungskonzentration der verwendeten Substanzen (5.4)

CTAB – Lösung	CTAB	0,0365 g
	Phosphatpuffer pH 6,5 (s.o.)	ad 10,0ml
DPH – Lösung	DPH	0,0244 g
	THF	ad 10,0 ml
PNA – Lösung	PNA	0,2195 g
	EtOH (> 99 % [V/V])	ad 100 ml
DC-Chol – Lösung	DC-Chol	0,2001 g
	CHCl ₃	ad 20,0 ml

Charakterisierung von kationischen Lipidvesikel (5.5)

CTAB-Vesikel (10 % TL)	SPC	5,9405 g
	CTAB	4,0595 g
	Phosphatpuffer pH 6,5 (s.o.)	ad 100,0 g

SPC/Polysorbat/DC-Chol – Vesikel (10 % TL)

Formulierung	SPC	Polysorbat 80	DC-Chol	Phosphatpuffer
SPC / Polysorbat/DC-Chol	[g]	[g]	[g]	[g]
30 / 10 / 4	6,122	3,367	0,511	90,000
30 / 10 / 5	6,045	3,325	0,631	90,000
30 / 10 / 10	5,686	3,127	1,187	90,000
30 / 20 / 10	4,332	4,765	0,904	90,000
30 / 20 / 20	3,972	4,370	1,658	90,000
30 / 24 / 3	4,197	5,540	0,263	90,000
30 / 24 / 6	4,090	5,398	0,512	90,000

Aufbereitung der verwendeten DNS (5.7)

DNS – Lösung	Kalbsthymus – DNS	100 mg
	Phosphatpuffer pH 6,5	ad 100,0 ml
TBE – Puffer pH 8,0	TRIS	108,0 g
	Na ₂ EDTA (0,5 M)	40 ml
	NaOH (2,0 M)	8 ml
	Borsäure	55,0 g
	Aqua ad injectabilia	ad 1,00 L
Agarosegel (0,3 %)	Agarose	0,45 g
	Phosphatpuffer	ad 150 g
Farbmarker – Lösung	Glycerol 85 %	2,1875 g
	Bromphenolblau Na-Salz	0,0088 g
	TBE – Puffer	1,30 g
Ethidiumbromid – Lösung	Ethidiumbromid	10,21 mg
	Aqua ad injectabilia	ad 1,00 g

Kinetik der DNS-Adsorption an kationische Vesikel (5.8)

flexible CTAB-Vesikel TL 0,2 % (s.o. [Charakterisierung])	40 ml
flexible CTAB-Vesikel TL 0,6 % (s.o. [Charakterisierung])	40 ml
Kalbsthymus – DNS (Größe ca. 8 kbp; in Phosphatpuffer pH 6,5 gelöst)	c = 0,3 µg/µl

Größenmessung der Vesikel mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (5.9)

Vesikel	SPC/Polysorbat/DC-Chol-Vesikel (30/10/4; TL 1 %, 5 %, 10 %); s.o.	
Lange DNS – Lösung	Kalbsthymus-DNS (> 12 kbp)	10,0 mg
	Phosphatpuffer pH 6,5	ad 10,0 ml
Plasmid-DNS-Lösung	Plasmid-DNS (für red-FP codierend)	10,0 mg
	Phosphatpuffer pH 6,5	ad 10,0 ml
Kurze DNS – Lösung	Kalbsthymus-DNS (< 1 kbp)	10,0 mg
	Phosphatpuffer pH 6,5	ad 10,0 ml

Analytik der Vesikel (5.10.1)

SPC-CTAB-Vesikel

DNS	Kalbsthymus-DNS (ca. 8 kbp)	c = 0,3 µg/µl
flexible CTAB-Vesikel TL 0,2 % (s.o. [Charakterisierung])		40 ml

SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel

Bestimmung des SPC und Polysorbat Gehaltes

Stammlösung SPC	SPC	20 mg
	Isopropanol	ad 20,0 ml
Stammlösung Polysorbat	Polysorbat 80	20 mg
	Isopropanol	ad 20,0 ml

Bestimmung des DC-Chol-Gehaltes

Stammlösung SPC	SPC	100 mg
	Dichlormethan	ad 20,0 ml
Stammlösung Polysorbat	Polysorbat 80	100 mg
	Dichlormethan	ad 20,0 ml
Stammlösung DC-Chol	DC-Chol	20 mg
	Dichlormethan	ad 20,0 ml

Bestimmung des DNS-Gehaltes

Flexible Vesikel (SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/4; TL 1 %)

DNS – Lösung	DNS (< 1 kbp)	c = 1 µg/µl
EtBr – Lösung	Ethidiumbromid	6,187 mg
	Phosphatpuffer	Ad 10,0 ml

in vitro Experimente mit Zellkulturen (HEK-Zellen) (5.11)

Vesikel	SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/5	TL 10 %, 5 %, 1 %, 0,2 %
(s.o. [Charakterisierung])	SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/8,4	TL 10 %, 5 %, 1 %, 0,2 %
	SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/20/9,8	TL 10 %, 5 %, 1 %, 0,2 %
DNS-Lösung	Plasmid – DNS (für GFP codierend)	c = 1,0 µg/µl
MEM-Puffer		

in vivo Experimente mit Mäusen (5.12)

Vesikel

	30/10/4	30/24/3	30/24/6
Gesamtlipidgehalt (TL)	5 %	10 %	10 %
SPC [g]	0,3061	0,4197	0,4090
Polysorbat 80 [g]	0,1684	0,5540	0,5398
DC-Chol [g]	0,0256	0,0263	0,0512
Rhodamin-DHPE [g]	0,0050	0,0005	0,0005
Phosphatpuffer [g]	9,5000	9,0000	9,0000

DNS-Lösung

DNS

Plasmid-DNS (für GFP codierend)	c = 1 µg/µl
Plasmid-DNS (für CFP codierend)	c = 1 µg/µl
Plasmid-DNS (für red-FP codierend)	c = 1 µg/µl

5.4 Kritische Mizellbildungskonzentration der verwendeten Substanzen

Die CMC der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen Polysorbat 80 und SPC wurde aus der Literatur übernommen. Sie beträgt für SPC in 50 mM Phosphatpuffer etwa $2 \cdot 10^{-10}$ mM [101] und für Polysorbat 80 etwa 12 μ M [102].

Für die beiden verwendeten kationischen Detergentien CTAB und DC-Chol wurde die CMC experimentell bestimmt. Es gibt verschiedene Methoden zur Bestimmung der CMC; in dieser Arbeit wurde eine Methode verwendet, bei der man ausnutzt, daß bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe in wässriger Umgebung kaum fluoreszieren. Liegt das Detergens in einem solchen Medium in einer Konzentration vor, die kleiner ist als seine CMC, so steigt der Fluoreszenzwert der wässrigen Farbstofflösung kaum an, da sich das zugegebene Detergens in Form von Monomeren in der Lösung befindet. Ist das Detergens jedoch in einer Konzentration gelöst, die größer ist als seine CMC, so bildet es Mizellen, in die sich der Fluoreszenzfarbstoff einlagert, was zu einem starken Fluoreszenzanstieg führt. Beispiele für solche Farbstoffe sind z.B. *Diphenylhexatrien* (DPH) oder *N-Phenyl-1-Naphthylamin* (PNA).

Für die CMC-Bestimmung des relativ gut wasserlöslichen CTAB wurde 500 μ l Phosphatpuffer in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und 1 μ l der DPH – Lösung zugegeben. Anschließend wurden unterschiedliche Mengen der CTAB-Lösung dazupipettiert und mit Phosphatpuffer auf 1,0 ml aufgefüllt. Zehn Minuten nach dem Mischen wurde die Fluoreszenz der Suspension gemessen ($\lambda_{\text{Exzit.}} = 350$ nm; $\lambda_{\text{Emiss.}} = 452$ nm).

Für die Bestimmung der CMC des wenig wasserlöslichen DC-Chol wurde das Experiment folgendermaßen durchgeführt:

Eine Glasschale mit flachem Boden und etwa 20 cm Durchmesser wurde mit einer Mischung aus Chloroform und Methanol (2/1 [V/V]) gereinigt, um eventuell vorhandene Detergensreste zu entfernen. Nach dem vollständigen Verdunsten der Reinigungsflüssigkeit unter dem Abzug wurden 250 ml Phosphatpuffer in die Glasschale gefüllt und 250 μ l der PNA-Lösung zugegeben. Anschließend wurden mit einer Transferpette steigende Volumina der DC-Chol – Lösung in die Mitte der Glasschale auf die Flüssigkeitsoberfläche pipettiert, woraufhin das Lösungsmittel sofort verdunstete. Damit sich die DC-Chol – Moleküle, die beim Verdunsten des Lösungsmittels ausfallen, gleichmäßig im Phosphatpuffer verteilen, wurde die Lösung zehn Minuten gerührt, bevor eine Probe am Fluorimeter vermessen wurde ($\lambda_{\text{Exzit.}} = 337$ nm; $\lambda_{\text{Emiss.}} = 426$ nm). Vor der Zugabe von weiterer DC-Chol – Lösung wurde die für das Vermessen am Fluorimeter gezogene Probenlösung wieder in die Glasschale zurückgegeben, damit sich das Gesamtvolumen während der Bestimmung nicht ändert. Jede Probe wurde 6 mal über je 16 Sekunden Integrationszeit gemessen. Da in der Literatur keine Angaben über die CMC

von DC-Chol zu finden sind, wurde die Messung mit DPH als Fluoreszenzfarbstoff wiederholt, um eine genauere Bestimmung der CMC von DC-Chol zu erhalten. Dabei wurden, um auf dieselbe molare Konzentration an Fluoreszenzfarbstoff zu kommen, den 250 ml Phosphatpuffer noch 205 μ l der DPH-Lösung zupipettiert und die o.g. Wellenlängen für DPH verwendet; alle weiteren Versuchsbedingungen wurden konstant gehalten.

5.5 Charakterisierung von kationischen Lipidvesikeln

5.5.1 Ermittlung der Solubilisierungskurve von SPC-CTAB – Vesikeln

Um das optimale molare Verhältnis von SPC und CTAB für die Herstellung von kationischen flexiblen Vesikeln zu ermitteln, wurde eine Solubilisierungskurve aufgenommen, die im Prinzip folgendermaßen aussieht:

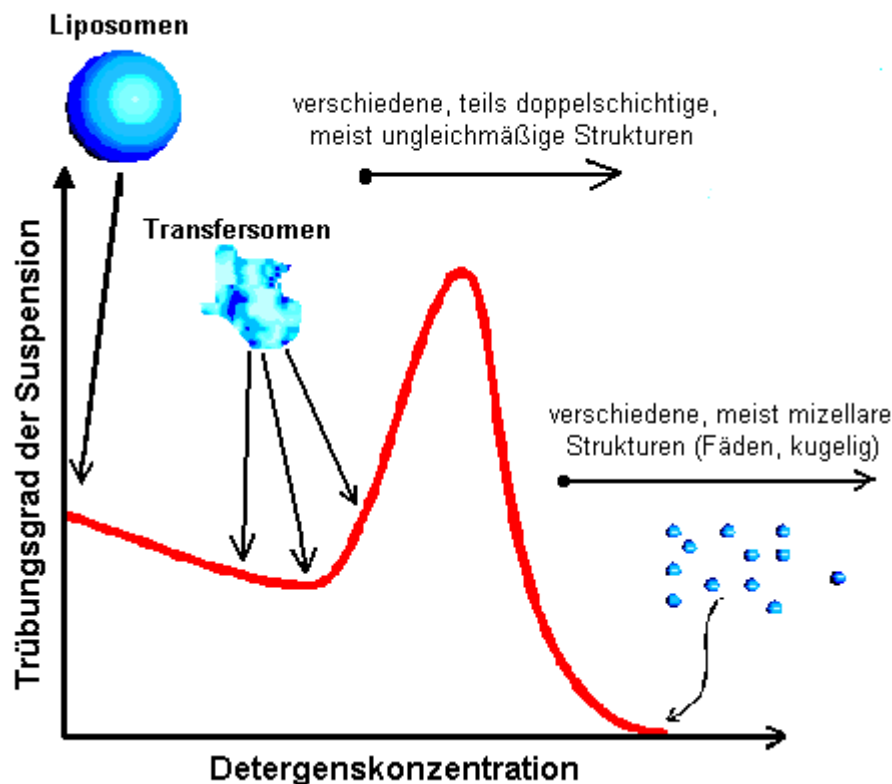


Abbildung 10: Solubilisierungskurve eines Phospholipids durch ein Detergens

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Aufnahme der Solubilisierungskurve von SPC mit CTAB eine Ansatzreihe hergestellt, bei der der SPC-Gehalt konstant gehalten und der Detergensanteil im Verlauf der Versuchsreihe erhöht wurde. Der Gesamtansatz betrug immer 1 ml; gemessen wurde die Absorption der Suspensionen bei 550 nm, die ein Maß für die Trübung der Suspension darstellt.

Da das Verhältnis der Ladungen von kationischem Lipid und DNS an verschiedenen Stellen dieser Arbeit auftaucht, erfolgt hier die Ladungsberechnung für die mit CTAB hergestellten flexiblen Vesikel: Geht man von o.g. Formulierung CTAB/SPC im molaren Verhältnis von 1,5/1 aus, so enthält 1 ml einer solchen Suspension mit TL = 10 % 40,595 mg CTAB. Geht

man von Vesikeln mit einem Radius von 60 nm und von einer Membrandicke von 4 nm aus, so lassen sich diese Vesikel aufgrund der Membrandoppelschicht vereinfacht als zwei „Kugeln“ mit einem Radius von 60 nm bzw. 56 nm betrachten. Daraus resultieren Oberflächen dieser beiden Kugeln ($4\pi r^2$) von etwa 45.000 nm² und 39.000 nm². Für die Bindung der DNS sind nur die Ladungen in der äußeren Halbmembran entscheidend. Da sich das CTAB bei der Herstellung der flexiblen Vesikel gleichmäßig auf die innere und äußere Halbmembran verteilen dürfte, stehen etwa 53,4 % CTAB für die Bindung von DNS zur Verfügung. Erhöht sich der Vesikelradius von 60 nm auf 100 nm, so sind dies noch 52,0 %, also ein Unterschied, der zu vernachlässigen ist. Als quartäres Ammoniumderivat ist CTAB unabhängig vom pH-Wert positiv geladen; daraus ergibt sich: 1 ml einer Suspension mit CTAB/SPC im molaren Verhältnis von 1,5/1 und 10 % TL enthält bei einem Radius von 60 nm

$$[m_{\text{CTAB}}/M_{\text{CTAB}}] \cdot N_A = [(21,678 \cdot 10^{-3} \text{ g})/(364,46 \text{ g/mol})] \cdot 6,023 \cdot 10^{23} = 3,6 \cdot 10^{19} \text{ Ladungen.}$$

5.5.2 Rezepturfindung für die SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel

Bei den SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikeln wurde ein anderer Weg für das Auffinden der optimalen Zusammensetzung gewählt: Ausgehend von einer molaren Membranzusammensetzung von 3/1 und 1/1 [SPC/Polysorbat], wurden bei der Herstellung mittels Filmmethode unterschiedliche Mengenverhältnisse SPC, Polysorbat und DC-Chol eingewogen und der Einfluß dieses Moleküls auf die Flexibilität der daraus entstehenden Vesikel geprüft (s. 6.6.2). Die genaue Zusammensetzung der in dieser Arbeit untersuchten SPC/Polysorbat/DC-Chol – Vesikel ist in Kapitel 5.3 angegeben.

Als tertiäres Amin ist DC-Chol pH-abhängig geladen; der scheinbare pK_s – Wert von DC-Chol, also der pK_s – Wert in der Vesikelmembran, liegt bei 7,4 [103]. Nach der Henderson-Hasselbalch – Gleichung läßt sich der Anteil an protoniertem DC-Chol (nur das steht zur Bindung der DNS zur Verfügung) nach folgender Formel berechnen:

$$pH = pK_s - \log \frac{[DC - Chol_{\text{protoniert}}]}{[DC - Chol_{\text{neutral}}]}$$

Daraus ergibt sich bei einem pH – Wert von 6,5, wie ihn der verwendete Phosphatpuffer aufweist, und einem pK_s von 7,4 ein Verhältnis von protoniertem zu unprotoniertem Anteil an DC-Chol von 7,94/1, d.h. etwa 88,8 % des eingesetzten DC-Chols ist geladen. 1 ml einer Vesikelsuspension mit TL 10 % der Formulierung 30/10/4 (SPC/Polysorbat/DC-Chol) enthält daher $[2,7287 \text{ mg}/500,81 \text{ g/mol}] \cdot 6,023 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} \cdot 0,888 = 2,9 \cdot 10^{18} \text{ Ladungen.}$

5.6 Herstellung von flexiblen Vesikeln

Die Herstellung von flexiblen Vesikeln unterscheidet sich nicht wesentlich von der Herstellung konventioneller Liposomen, so daß das Verfahren in beiden Fällen aus Mischen und Filtrieren besteht. Für das Mischen der Bestandteile gibt es zwei Möglichkeiten:

1. Suspensionsmethode: Dabei wird zunächst der Puffer hergestellt, in dem die Vesikel nach ihrer Herstellung vorliegen sollen. Anschließend werden diesem Puffer alle Bestandteile zugegeben und nach Zugabe eines kleinen Rührmagneten mindestens 24 Stunden gerührt, bis eine homogene Suspension entstanden ist. Diese Art der Herstellung wird für Formulierungen benutzt, bei denen alle verwendeten Bestandteile gut in Wasser löslich bzw. dispergierbar sind, also für die in dieser Arbeit verwendeten CTAB-Vesikel, die aus CTAB und SPC in einem molaren Verhältnis von 1,5/1 bestehen. CTAB steht dabei für *Cetyltrimethylammoniumbromid*, SPC für *Sojaphosphatidylcholin*; die Strukturformeln dieser Stoffe sind in Abbildung 9 aufgeführt. Als Phospholipid wurde ein gereinigtes Naturprodukt aus Soja verwendet, das in Form eines wachsartigen, weißen bis gelblichen Granulats vorliegt, mehr als 95 % Phosphatidylcholin (Lecithin) enthielt und bei dem als langkettige Fettsäuren vorwiegend Palmitin- und Ölsäure vorkommt [104].
2. Filmmethode: Bei der Filmmethode werden alle Vesikelkomponenten in einen Rundkolben eingewogen und anschließend die 10fache Menge einer 1:1 (V/V) – Mischung aus z.B. Dichlormethan und Methanol zugegeben. Dann dampft man das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei ca. 40 °C bis zur Trockenheit ein, wobei dem Ansatz zuvor noch Glaskügelchen zugegeben werden, um einen Siedeverzug zu verhindern und die Adsorptionsoberfläche zu vergrößern. Beim Eindampfen werden die Glaskügelchen und die Kolbenwand mit einem feinen Lipidfilm überzogen, in dem die Bestandteile der flexiblen Vesikel homogen verteilt sind. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird der mit dem Lipidfilm überzogene Rundkolben für mindestens 12 Stunden im Exsikkator getrocknet. Der Exsikkator ist während der gesamten Zeit an eine Vakuumpumpe angeschlossen; nur so ist gewährleistet, daß das Lösungsmittelgemisch komplett wieder entfernt wird und keine Reste davon im Lipidfilm inkorporiert sind. Abschließend wird die entsprechende Menge des gewünschten Puffers (= Dispersionsmittel) zugegeben und so lange gerührt, bis sich eine homogene Suspension gebildet hat. Die Filmmethode wird verwendet, wenn nicht alle verwendeten Bestandteile ausreichend im Phosphatpuffer löslich/dispergierbar sind, wie dies bei den in dieser Arbeit verwendeten DC-Chol-Vesikeln der Fall ist, die aus SPC, Polysorbat und DC-Chol bestehen.

Die mit einer der beschriebenen Methoden hergestellte Vesikelsuspension sieht homogen aus, besteht aber aus einem Gemisch von kleinen, mittleren und großen sowie aus ein- oder mehrschaligen Vesikeln. Zur besseren Homogenisierung auf mikroskopischer Skala wird die Vesikelsuspension schrittweise mehrfach durch Polycarbonatfilter mit Poren abnehmenden Durchmessers von 600 nm bis 100 nm filtriert. Die resultierende Vesikelsuspension ist weitgehend monodispers, was durch eine abschließende Messung mittels PCS überprüft wird. Der Durchmesser von Vesikeln, die in dieser Arbeit verwendet wurden, lag zwischen 50 nm und 200 nm, der *Polydispersitätsindex* (PI) war meist $< 0,2$.

Anmerkung: Die in dieser Arbeit vorkommenden Angaben bezüglich des Gesamtlipidgehaltes (TL) sind Massenangaben. Ein TL von 10 % bedeutet z.B., daß von einer Gesamtmasse der Dispersion von 100 Gramm zehn Gramm aus den eingewogenen Bestandteilen für die flexiblen Vesikel und 90 Gramm aus Phosphatpuffer bestehen. Suspensionen mit einem niedrigeren Gesamtlipidgehalt als 10 % wurden hergestellt, indem man von einer Suspension mit 10 % TL ausging, die dann mit Phosphatpuffer entsprechend verdünnt wurde.

5.7 Aufbereitung der verwendeten DNS

Für die Experimente zur Bestimmung der Kinetik der DNS-Bindung an flexible Vesikel (s. Kapitel 5.8) wurden mehrere Milligramm DNS pro Experiment benötigt. Daher war es notwendig, preisgünstig eine ausreichende Menge DNS geeigneter Größe zu erhalten. Ein DNS-Verdau mittels Restriktionsenzymen kam daher aus Kostengründen nicht in Frage. Als durchführbare Alternativen wurden folgende Verfahren getestet, wobei jeweils Kalbsthymus-DNS in einer Konzentration von 1,0 mg/ml zum Einsatz kam, die in Phosphatpuffer pH 6,5 gelöst war.

- a. Vortexen auf höchster Stufe
- b. mehrfaches Aufziehen der DNS mit folgenden Kanülen:
1,2 mm x 40 mm sowie 0,9 mm x 40 mm und 0,4 mm x 19 mm
- c. Extrudieren mittels Handextruder und Polycarbonatfiltern mit einem Porendurchmesser von 400 nm, 100 nm und 80 nm
- d. mehrfaches Aufziehen der DNS mit einer 0,5 ml Hamilton-Spritze (Modell Microliter Nr. 725) mit einem Innendurchmesser von 0,15 mm
- e. Beschallen mit der Ultraschallspitze

Die Effekte dieser Zerkleinerungsverfahren wurden mit einer Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurde mit TBE-Puffer ein 0,3 %iges Agarosegel hergestellt, das Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,3 µg/ml enthält. In die Gelkammern der Elektrophoresekammer wurden jeweils 10 µl der o.g. Proben zusammen mit 1,5 µl Farbmarker gefüllt. Die Elektrophorese wurde in TBE-Puffer durchgeführt und ihr Ende durch die Lage des Farbmarkers bestimmt. Die Auswertung der Elektrophorese erfolgte bei 254 nm bzw. 366 nm, da sich das im Gel befindliche Ethidiumbromid in die Basenpaare der wandernden DNS einlagert, weshalb diese als helle Banden detektierbar sind. Die *Größe* der DNS wurde durch die Lage im Vergleich zu einem mitgelaufenen Längenstandard bestimmt, die *Größenverteilung* anhand der Breite der erhaltenen Banden.

Um die Reinheit der verwendeten DNS zu überprüfen, wurde eine Phenol/Chloroform – Extraktion durchgeführt und die Absorptionswerte der so gereinigten DNS bei 260 nm und 280 nm mit denen der unbehandelten DNS verglichen. Dabei ergab sich kein Unterschied, so daß für die beschriebenen Experimente direkt die gelieferte Kalbsthymus-DNS ohne weitere Aufreinigung verwendet wurde.

Da mehrwertige Kat- und Anionen wie Calcium oder Eisen sowie EDTA die Wechselwirkungen zwischen kationischen Liposomen und anionischer DNS beeinflussen [105], mußte die

verwendete DNS-Lösung absolut frei von diesen Bestandteilen sein. Da der DNS-Lieferant dies jedoch nicht garantieren konnte, wurde die zerkleinerte Kalbsthymus-DNS, die für die Titrations- und Kinetikversuche eingesetzt wurde, zunächst in einem TRIS/EDTA – Puffer gelöst und mittels Ultraschallspitze zerkleinert. Die durch den Abrieb der Ultraschallspitze entstandenen Metallteilchen wurden abzentrifugiert und eventuell vorhandene mehrwertige Kationen an das EDTA gebunden. Eine anschließende Dialyse, in der etwa 10 g DNS-Lösung gegen 10 mal einen Liter Phosphatpuffer ausgetauscht wurden, sorgte dafür, daß TRIS und EDTA entfernt wurden und die DNS schließlich in Phosphatpuffer gelöst war, also dem Lösungsmittel, das für die weiteren Experimente verwendet wurde. DNS wurde für die Dialyse in einer Konzentration von ca. 3 mg/ml eingesetzt, die Bestimmung der Absorption bei 260 nm erfolgte deshalb nach Verdünnung der DNS-Lösung mit Phosphatpuffer auf eine Konzentration von 1 mg/ml.

Bei einigen *in vitro* und sämtlichen *in vivo* Experimenten wurde Plasmid-DNS mit einer definierten Größe von ca. 6 kbp verwendet. Die Plasmid-DNS wurde durch Vermehren der DNS in *E. coli* und anschließendes Reinigen mit Hilfe einer von Quiagen mitgelieferten Anleitung gewonnen. Um sicherzustellen, daß die Plasmid-DNS ordnungsgemäß vermehrt wurde, wurden vor den weiteren Experimenten zwei Tests durchgeführt: ein DNS-Verdau mit Restriktionsenzymen und eine anschließende Gelelektrophorese der entstandenen Bruchstücke sicherte bei gleichen Mustern von Referenz-DNS und vermehrter Plasmid-DNS deren Identität. Die Funktionsfähigkeit, die v.a. für Zellkulturversuche mit Lipidvesikeln gegeben sein muß, wurde durch die erfolgreiche Transfektion von HEK 293 – Zellen nach der Zugabe von DNS und Fugene[®] gewährleistet.

5.8 Kinetik der DNS-Adsorption an kationische Vesikel

Um die Kinetik zu messen, wurden 40 ml Vesikelsuspension mit einem Gesamtlipidgehalt von 0,2 % bzw. 0,6 % in das Titrationsgefäß gefüllt. Zu dieser Suspension wurde in Abständen von 10 Sekunden mit dem Titrator in 10 µl – Schritten DNS-Lösung einer Konzentration von 0,3 µg/µl zupipettiert, bis eine bestimmte Menge DNS erreicht war. Um eine gründliche Durchmischung des gesamten Ansatzes zu gewährleisten, befand sich das Ende der Kapillare, durch die DNS zutitriert wurde, direkt über einem Magnetrührer, der während der gesamten Dauer des Experiments eingeschaltet war. Daher war es nicht immer zu vermeiden, daß Luft in das System eingetragen wurde. Die Abnahme der Transmission der Vesikelsuspension durch Zugabe der DNS wurde mittels einer Phototrode bestimmt (DP 550 Mettler Toledo: photometrischer Sensor, der die Lichtdurchlässigkeit einer Flüssigkeit mißt). Wenn eine Luftblase in den Strahlengang der Phototrode kam, resultierte dies in deutlichen Schwankungen der Transmission, was sich auch in der Titrationskurve bemerkbar machte. Nach der Zugabe von jeweils 0,6 mg DNS wurde für einen Zeitraum von bis zu 4 Stunden die Kinetik der Reaktion bestimmt, indem ohne weitere DNS-Zugabe, aber bei eingeschaltetem Rührer die Transmission der Mischung aus Lipidvesikeln und DNS gemessen wurde.

Für die Messung der Adsorptionskinetik von DNS an kationische Lipidvesikel kamen Suspensionen mit einem TL – Gehalt von 0,2 % und 0,6 % zum Einsatz. Dies lag daran, daß bei so geringen Gesamtlipidgehalten die Gefahr des Verklebens von Vesikeln mit der DNS minimal sein dürfte. Ein weiterer Grund dafür lag in den apparativen Bedingungen, da die verwendete Phototrode einen Lichtweg von 2 cm hatte. Da die Transmission der Vesikelsuspension im Verlauf einer Titration deutlich abnahm, konnten keine Suspensionen mit einem höheren Gesamtlipidgehalt als 0,6 % verwendet werden, da der Meßbereich der Phototrode durch die Zugabe der DNS in einen Bereich von $< 1\%$ gesunken wäre, und eine Kinetikmessung damit unmöglich geworden wäre.

5.9 Größenmessung der Vesikel mittels Photonenkorrelationsspektroskopie

Die Funktionsweise des in dieser Arbeit zur Größenmessung verwendeten Meßgerätes beruht auf dem Prinzip der dynamischen Lichtstreuung (Photonenkorrelationsspektroskopie = PCS) und ermöglicht Partikelgrößenbestimmungen im Nano- bis Mikrometerbereich. Die Dynamische Lichtstreuung wird benutzt, um aus der Brown'schen Molekularbewegung die Partikelgröße zu berechnen [106]. Dabei macht man sich die unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeiten von großen und kleinen Teilchen zunutze, um auf deren hydrodynamischen Radius zu schließen.

Fällt ein Lichtstrahl durch eine Suspension, werden die Photonen gestreut. Die Intensitätsschwankungen des gestreuten Laserlichts, die bei kleineren Teilchen aufgrund ihrer höheren Beweglichkeit viel schneller verlaufen als bei großen, werden von einem Detektor erfaßt und durch Bildung der Autokorrelationsfunktion (Fourier-transformiertes Frequenzspektrum) in Diffusionskonstanten umgerechnet. Diese Konstanten sind über die Stokes-Gleichung mit dem Radius korreliert.

Die Intensitätsfluktuationen werden dabei durch die zeitliche Autokorrelationsfunktion (g) beschrieben.

<u>Autokorrelationsfunktion:</u>	$g(k, \Delta t)$	=	$I(k, t) \cdot I(k, t + \Delta t)$
	[t	=	Zeit,
	$I(k, t)$	=	Intensität zur Zeit t ,
	$I(k, t + \Delta t)$	=	Intensität zur Zeit $t + \Delta t$
	k	=	Konstante
	Δt	=	infinitesimal kleines Zeitintervall]

Die Autokorrelationsfunktion entsteht, indem man $I(k, t)$, d.h. die Intensität I zur Zeit t und danach unter gleichen Bedingungen zur Zeit $(t + \Delta t)$ mißt und diese beiden Werte miteinander multipliziert. Diese Messungen werden für gleiche Δt sehr oft wiederholt, um das arithmetische Mittel zu berechnen. Wird diese Prozedur für verschiedene k und Δt durchgeführt, erhält man die ganze Autokorrelationsfunktion $g(k, \Delta t)$.

Die Meßanordnung in der Photonenkorrelationsspektroskopie sieht vereinfacht folgendermaßen aus: Laserlicht konstanter Intensität trifft auf die zu prüfende Suspension; das resultierende Streulicht wird bei einem Winkel von 90° von einem Photonenvervielfacher detektiert. Aus den ankommenden Signalen wird im Korrelator die Autokorrelationsfunktion gebildet. Mittels computergestützter Algorithmen wird der Diffusionskoeffizient D und daraus über die Stokes-Einstein-Beziehung

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}$$

der Partikelradius R errechnet, wenn Lösungsmittelviskosität η , Boltzmannkonstante k und Temperatur T bekannt sind.

Zur Auswertung der Autokorrelationsfunktion gibt es verschiedene Methoden:

Die Inverse Laplace Transformation (ILT) basiert auf der sogenannten „exponential sampling“ – Methode, bei der die Autokorrelationsfunktion als eine Summe diskreter Exponentialfunktionen in logarithmischem Abstand repräsentiert wird. Die Methode eignet sich v.a. für multimodale Verteilungen. Breite Verteilungen werden hier durch mehrere scharfe Maxima angezeigt.

Die Kumulantenanalyse (CUM) ist für eine monomodale Teilchengrößenverteilung in der Suspension geeignet. Dabei wird aus der Autokorrelationsfunktion ein Polynom (s.u.) entwickelt, dem eine Gauss'sche Verteilung der Partikelgrößen zugrunde liegt. Die ersten drei Koeffizienten (Kumulanten) entsprechen dabei Mittelwert, Breite und Assymmetrie der Größenverteilung. Ein Synonym für die Verteilungsbreite (Varianz) ist der sogenannte Polydispersitätsindex.

Polynom: $\log(G) = a + bt + ct_2 + dt_3 + \dots$
 $a, b, c, d, \dots = \text{Kumulanten}, t = \text{Zeit}$

Polydispersitätsindex: $PI = 2 \cdot c/b^2 = \sigma^2$
 $\sigma^2 = \text{Varianz}$

Bei der kontinuierlichen ILT-Auswertung (CONTIN) wird die Korrelationsfunktion einer beliebigen glatten Größenverteilung an die Meßdaten angepaßt. Dabei wird verhindert, daß breite Verteilungen als Überlagerung mehrerer Peaks interpretiert werden. Die CONTIN-Analyse stellt das Ergebnis mit der besten Anpassung und der einfachsten Verteilung dar und eignet sich somit auch für multimodale Verteilungen.

Jeder der angegebenen PCS-Meßwerte dieser Arbeit stellt den Mittelwert aus mindestens vier Einzelmessungen dar. Als Maß für die Größenverteilung der Vesikelsuspensionen dient im Fall der CONTIN – Analyse die relative Breite, bei der CUM – Analyse ist dies der Polydispersitätsindex. Die relativen Breiten der Einzelmessungen bei der CONTIN – Analyse wiesen deutliche Schwankungen auf, während die Polydispersitätsindizes bei der CUM – Analyse recht konstant waren, wie in Anhang 8 exemplarisch aufgeführt ist. Daher wurden für die Auswertung der Größenmessung die Werte der Kumulanten-Analyse verwendet. Dies ist möglich, da die untersuchten Vesikelsuspensionen trotz ihrer teilweise beträchtlichen Streuung der Partikelgröße durchweg unimodale Verteilungen aufweisen, was bei jeder Messung durch die Bestimmung von CUM- und CONTIN – Analyse gezeigt wurde. Die dynamische Lichtstreuung ermöglicht eine schnelle und zerstörungsfreie Messung des Partikelradius. Da

die Streulichtintensität in der sechsten Potenz vom Durchmesser der Teilchen abhängt, ist es sehr wichtig, unter sehr sauberen Bedingungen zu arbeiten, denn große Partikel, wie z.B. Staubkörnchen, können aufgrund ihrer großen Meßsignale kleine Teilchen überdecken.

Die PCS – Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurden folgendermaßen durchgeführt: Vor jeder Meßreihe wurde eine Kontrollmessung mit Latexpartikeln bekannter Größe durchgeführt. Die zu vermessende Probe wurde mit bidestilliertem Wasser in einer zylindrischen Küvette so weit verdünnt, daß eine Meßintensität im Bereich von 30 kHz bis 500 kHz erreicht wurde. Dieser Bereich ist notwendig, da für eine korrekte Messung eine gewisse Mindeststreuung nötig ist, bei einer zu hohen Konzentration aber zunehmend Mehrfachstreuung auftritt, was eine Interpretation der Daten nicht mehr möglich macht.

Die Küvette wurde in den auf 25,0 °C temperierten Probenhalter des Partikelgrößenmeßgeräts gestellt, so daß sie sich während der Messung im Strahlengang des Lasers befand. Gemessen wurde mit Hilfe eines Lasers bei einer Wellenlänge von 632,8 nm, der Diffraktionsindex betrug 1,332. Die Meßdauer betrug jeweils 20 Sekunden und wurde über die zugehörige Software gestartet und ausgewertet.

5.10 Penetration Assay

Der in dieser Arbeit verwendete *Penetration Assay* (PA) ist eine speziell für flexible Vesikel entwickelte Analysenmethode, mit der die Verformbarkeit der Vesikel in einem anisotropen Scherfeld gemessen wird.

Dabei wird etwa 1 ml der zu untersuchenden Suspension in eine Edelstahl-Filterkerze gegeben, in die ein Filter mit einer Porengröße von 30 nm eingebaut war. Wurde eine andere Porengröße verwendet, so ist das an der entsprechenden Stelle im Ergebnisteil aufgeführt. Legt man an diese Apparatur Stickstoff-Druck an, so wird die Suspension durch die Filter gepreßt. Wenn die Porengröße um mindestens den Faktor zwei kleiner ist als der Durchmesser der flexiblen Vesikel, so kann beim Anlegen eines geringen Drucks ($\leq 1,0$ MPa) ausgeschlossen werden, daß es sich bei den Vesikeln im Filtrat um Liposomen handelt, d.h. nur flexible Lipidvesikel, nicht jedoch starre Liposomen sind bei diesem Druck dazu in der Lage, Filter mit einer Porengröße zu passieren, die kleiner sind als die Hälfte ihres Radius [107]. Die Filtratmenge pro Zeiteinheit wird mittels Analysenwaage und angeschlossenen Rechner gemessen und erlaubt so die Bestimmung der Flußrate in Abhängigkeit von der Zeit und dem angelegten Druck. Um eventuell auftretende Filtrationsverluste bei der Passage von Lipidvesikeln, DNS und DNS-Lipidvesikeln zu bestimmen, wurden – je nach Zusammensetzung der Suspension – Methoden zur Quantifizierung der einzelnen Bestandteile entwickelt.

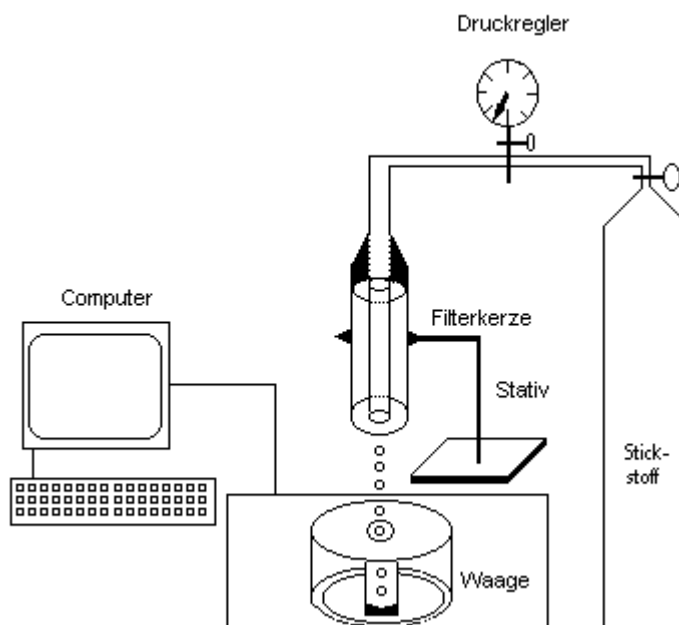


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Penetration-Assay

Die Penetrationsrate P wird aus den Parametern Zeit (t), Druck (p), Filtrationsfläche (A) und filtrierte Masse (m) berechnet und hat die Einheit [s/m]:

$$P = \frac{m}{pA\Delta t}$$

Trägt man die Penetrationsrate (P) logarithmisch über den angelegten Drücken (p) auf, ergibt sich beim Vorliegen von sehr flexiblen Vesikeln eine sigmoide Kurve. Diese lässt sich qualitativ analysieren und semiquantitativ durch die Lage der Penetrationskurve evaluieren: Je weiter der Wendepunkt der Kurve zu niedrigen Drücken verschoben ist, desto deformierbarer sind die Vesikel; vergleichbar sind dabei jedoch nur die Daten, die mit Suspensionen des gleichen Gesamtlipidgehaltes gemessen wurden.

5.10.1 Analytik der Vesikel

Nach der Filtration von flexiblen Vesikeln mit und ohne DNS mußte überprüft werden, wieviel Lipidsuspension und wieviel DNS noch im Filtrat zu finden waren.

5.10.1.1 Spektroskopie der SPC-CTAB – Vesikel

Nach der Kombination von flexiblen CTAB-Vesikeln mit DNS und dem folgenden Penetration-Assay war es notwendig, die Menge an flexiblen CTAB-Vesikeln und an DNS vor und nach der Passage der Poren zu quantifizieren. Es wurde versucht, mittels UV-Photometer nach der Aufnahme *eines* Spektrums der DNS-Lipidvesikel *beide* Bestandteile (Lipidvesikel und DNS) zu quantifizieren. Sowohl die DNS-Lösung, als auch die Suspension aus flexiblen Vesikeln wurde dazu in einer Konzentration hergestellt, in der sie auch bei den später zu testenden Formulierungen vorliegen, d.h. es wurden CTAB-Vesikel mit einem Gesamtlipidgehalt von 0,2 % sowie Kalbsthymus-DNS in einer Konzentration von 36,9 µg/ml verwendet. Sowohl die DNS-Lösung, als auch die Vesikelsuspension wurde 1:1 (V/V) mit Isopropanol gemischt, was notwendig ist, um die Vesikel komplett zu solubilisieren. Das Gefäß wurde mit Parafilm verschlossen, kräftig geschüttelt und nach dem Aufsteigen der entstandenen Gasblasen ein UV-Spektrum von 200 nm bis 400 nm aufgenommen, wobei als Referenzlösung eine Mischung aus 500 µl Phosphatpuffer und 500 µl Isopropanol diente. Abbildung 12 zeigt auf der linken Seite die Spektren von CTAB-Vesikeln und DNS in den Konzentrationen, wie sie bei 100 %iger Wiederfindung von flexiblen Vesikeln und DNS im Filtrat zu erwarten waren und auf der rechten Seite die Differenz der beiden Spektren.

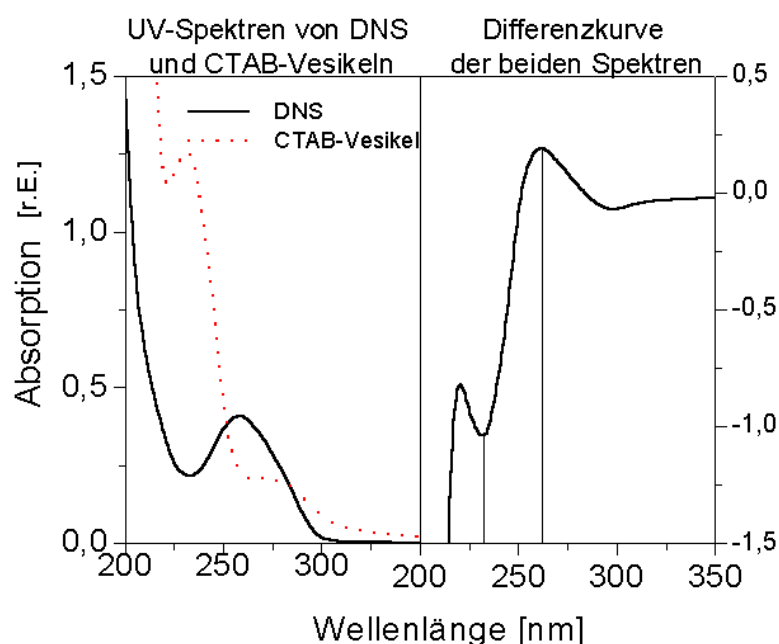


Abbildung 12: UV-Spektren von CTAB – Lipidvesikeln und von DNS

Die Absorption der jeweils anderen Komponente ist bei bestimmten Wellenlängen minimal, d.h. die Absorption der DNS wird ist bei 260 nm am wenigsten von den Lipidvesikeln beeinflusst und der störende Einfluß der DNS auf die Absorption der Lipidvesikel ist bei 232 nm minimal. Daher wurden von beiden Bestandteilen Lösungen in einem Isopropanol/ Wasser – Gemisch (1/1) hergestellt und von jeder Lösung die Absorption bei 232 nm und bei 260 nm gemessen, um daraus die spezifische Absorption (A^*) jeder Komponente bei jeder Wellenlänge zu bestimmen. Anschließend wurden die Absorptionen von DNS-CTAB-Lipid-vesikeln bei diesen beiden Wellenlängen gemessen, die bei der Durchführung eines Penetration-Assays bei verschiedenen Drücken gewonnen wurden. Der Gehalt an Lipid und DNS wurde nach folgenden Formeln bestimmt:

$$\text{I. } A_{\text{ges.232 nm}} = A_{\text{Susp.232 nm}} + A_{\text{DNS232 nm}} = A^*_{\text{Susp.232 nm}} \cdot c_{\text{Susp.}} + A^*_{\text{DNS232 nm}} \cdot c_{\text{DNS}} \text{ sowie}$$

$$\text{II. } A_{\text{ges.260 nm}} = A_{\text{Susp.260 nm}} + A_{\text{DNS260 nm}} = A^*_{\text{Susp.260 nm}} \cdot c_{\text{Susp.}} + A^*_{\text{DNS260 nm}} \cdot c_{\text{DNS}}$$

Aufgelöst nach $c_{\text{Susp.}}$ und c_{DNS} ergibt sich:

$$\text{I.}' \quad c_{\text{Susp.}} = \frac{A_{\text{ges.260nm}} \cdot A^*_{\text{DNS232nm}} - A_{\text{ges.232nm}} \cdot A^*_{\text{DNS260nm}}}{A^*_{\text{Susp.260nm}} \cdot A^*_{\text{DNS232nm}} - A^*_{\text{DNS260nm}} \cdot A^*_{\text{Susp.232nm}}}$$

$$\text{II.}' \quad c_{\text{DNS}} = (A_{\text{ges.232nm}} - (\frac{A_{\text{ges.260nm}} \cdot A^*_{\text{DNS232nm}} - A_{\text{ges.232nm}} \cdot A^*_{\text{DNS260nm}}}{A^*_{\text{Susp.260nm}} \cdot A^*_{\text{DNS232nm}} - A^*_{\text{DNS260nm}} \cdot A^*_{\text{Susp.232nm}}})) / A^*_{\text{DNS232nm}}$$

5.10.1.2 Spektroskopie der SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel

5.10.1.2.1 Bestimmung des SPC und Polysorbat – Gehaltes

Methodenentwicklung

Das UV-Spektrum von DNS interferiert mit den Spektren von SPC und Polysorbat, in den zu untersuchenden Formulierungen war jedoch bei gleichem TL – Gehalt nur etwa 10 % der DNS-Menge enthalten wie bei den mit DNS beladenen SPC-CTAB – Vesikel. Daher wurde die im folgenden beschriebene Methode zur Bestimmung von SPC und Polysorbat nicht durch DNS gestört. Das DC-Chol in den Vesikeln absorbiert in der vorliegenden Konzentration zwischen etwa 220 nm und 400 nm nicht nennenswert (s. Abbildung 13). Das UV-Spektrum von SPC ist im Bereich von 220 nm bis 400 nm vom Spektrum des Polysorbat überlagert:

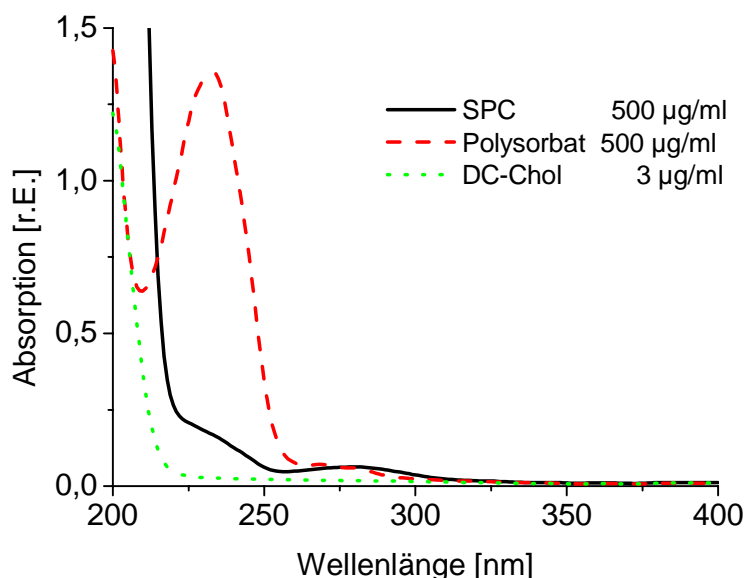


Abbildung 13: UV-Spektren von SPC, Polysorbat und DC-Chol

Zur Erhöhung der Meßgenauigkeit wurde das gesamte Spektrum für die Auswertung verwendet. Es wurde getestet, ob sich die Absorptionen der beiden Stoffe einfach addieren lassen oder ob es zu einer Beeinflussung der Adsorption eines Stoffes aufgrund der Anwesenheit des jeweils anderen kommt. Dazu wurden Mischungen aus SPC und Polysorbat in bekannten Mengen hergestellt, die Absorption dieser Substanzen im Bereich von 200 nm – 400 nm bestimmt und anschließend mit der Addition der Einzelspektren verglichen. Die Auswertung dieser Spektren ergab, daß sich die Absorptionen der Einzelstoffe bei Gemischen problemlos addieren lassen (s. Abbildung 14). Bei den später zu bestimmenden Proben wurde jeweils ein

UV-Spektrum vor und nach der Filtration im Bereich von 200 nm und 400 nm aufgenommen. Solange die Spektren der Probe vor und nach der Filtration keine deutlichen Unterschiede aufwiesen, war eine Auftrennung der Spektren in die beiden Bestandteile nicht notwendig.

Standardmethode

Durchgeführt wurden sämtliche UV-Messungen für die Bestimmung von SPC und Polysorbat in den Vesikelsuspensionen nach folgender Methode: Die Zusammensetzung der vermessenen Lösungen betrug immer 1 ml, zusammengesetzt aus 500 μ l einer isopropanolischen Lösung und 500 μ l einer Pufferlösung. Der Einsatz einer 1:1 Mischung aus Phosphatpuffer und Isopropanol erfolgte auch hier, um die Vesikel komplett zu solubilisieren.

Wurden Mischungen der Stammlösungen vermessen, so wurde in einer Quarzküvette das Volumen von 500 μ l – x μ l SPC-Stammlösung – y μ l Polysorbat-Stammlösung (s. 5.3) ad 500 μ l mit Isopropanol aufgefüllt, bevor abschließend 500 μ l Phosphatpuffer zupipettiert wurden. Wurde Vesikelsuspension vermessen, so wurde das entsprechende Volumen Suspension ad 500 μ l mit Phosphatpuffer aufgefüllt, bevor 500 μ l Isopropanol zupipettiert wurden. Das Behältnis wurde mit einem Parafilm verschlossen, kräftig geschüttelt, nach dem Aufsteigen der entstandenen Gasblasen ein Spektrum von 200 nm bis 400 nm aufgenommen, wobei als Referenzlösung eine Mischung aus 500 μ l Phosphatpuffer und 500 μ l Isopropanol diente.

Die folgende Abbildung zeigt die gute Übereinstimmung zwischen den gemessenen Spektren und den aus den Einzelspektren errechneten Absorptionen grafisch:

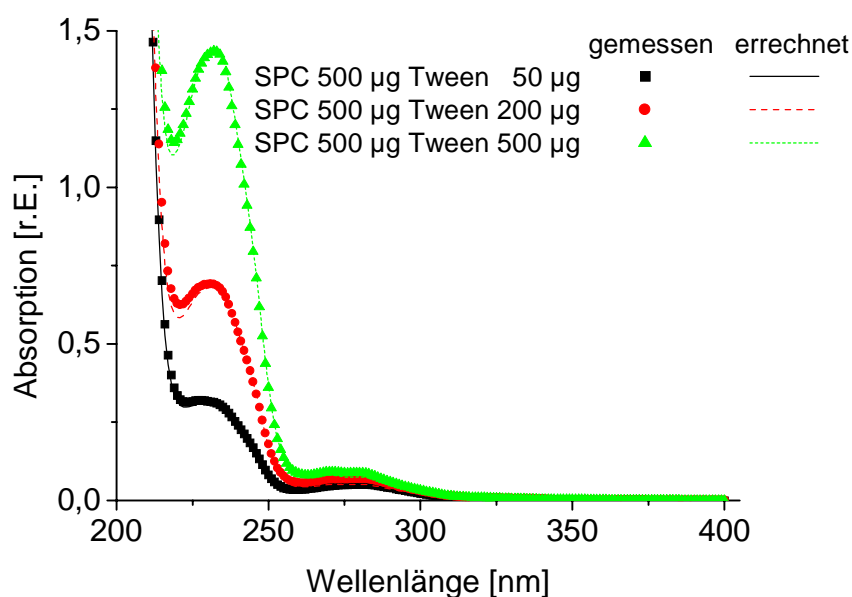


Abbildung 14: UV-Spektren von verschiedenen SPC/Polysorbat – Mischungen

5.10.1.2 Bestimmung des DC-Chol – Gehaltes

Methodenentwicklung

Da DC-Chol im Bereich von 200 nm – 800 nm keine nennenswerte Absorption aufweist, wurde nach einer Farbreaktion gesucht, um diesen Bestandteil der Vesikel indirekt zu quantifizieren. In der Literatur [108] ist ein Verfahren beschrieben, das bereits für eine GMP-gerechte Prüfung von Liposomen auf DC-Chol verwendet wurde. Diesem Verfahren liegt eine bereits in den 70er Jahren durchgeführte modifizierte Liebermann-Burchard-Reaktion zugrunde [109], also eine Reaktion, die spezifisch ist für ein 3-OH-Steroid, das an Position 5 ungesättigt ist; in Abbildung 15 ist der Reaktionsmechanismus zu sehen, der dieser Reaktion zugrunde liegt.

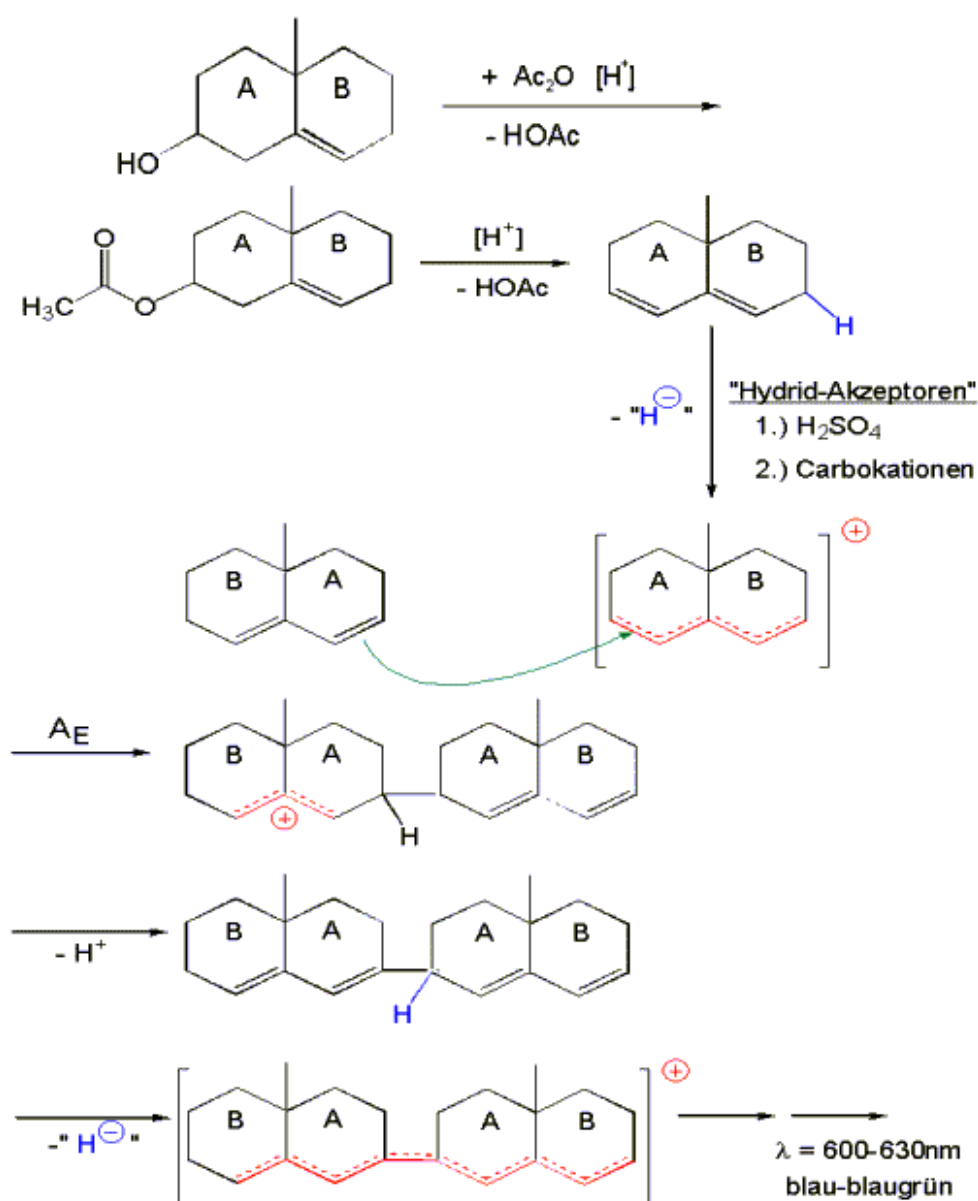


Abbildung 15: Reaktionsmechanismus für die Bestimmung von DC-Chol

Bei dem von Sorgi [108] beschriebenen Verfahren wurde die Vesikelsuspension vor ihrer Verwendung lyophilisiert, in Chloroform aufgenommen und anschließend 900 µl Acetanhydrid zugesetzt; gestartet wurde die Reaktion dann durch Zugabe von 100 µl konzentrierter Schwefelsäure; der entstehende Farbstoff wurde bei 625 nm vermessen. Diese Methode hatte einen Linearitätsbereich von 50 – 2000 µg DC-Chol, der Korrelationskoeffizient der Kalibriergerade war 0,998.

Da ein Lyophilisierungsschritt für die DC-Chol Bestimmung einen großen zeitlichen Aufwand bedeutet hätte, mußte die beschriebene Reaktion für diese Arbeit weiter modifiziert werden. Eine Extraktion des DC-Chols aus dem Ansatz wäre zwar grundsätzlich möglich gewesen, hätte jedoch den Fehler vergrößert. Um diese beiden Möglichkeiten zu vermeiden, wurde versucht, 10 µl wässrige Vesikelsuspension pro 1 ml Gesamtvolumen für den Nachweis zu verwenden. Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden SPC-, Polysorbat- und DC-Chol-Stammlösungen (jeweils in Dichlormethan gelöst) hergestellt.

Folgende Fragen wurden untersucht:

- 1) Wie wirkt sich eine Zusammensetzung von 550 µl Dichlormethan, 10 µl Phosphatpuffer, 400 µl Acetanhydrid und 40 µl konzentrierte Schwefelsäure auf die Reaktion aus?
- 2) Bei welcher Wellenlänge liegt das Absorptionsmaximum des gebildeten Farbstoffs unter den in 1) genannten Bedingungen? Nach welcher Zeit wird das Absorptionsmaximum unter den in 1) genannten Bedingungen erreicht?
- 3) Wie stark beeinflussen SPC, Polysorbat und DNS, die in den verwendeten Suspensionen als Begleitsubstanzen vorliegen, die Reaktion?
- 4) Wie groß ist der lineare Bereich der Reaktion unter den Bedingungen von 1)?

Dabei wurden in Vorversuchen folgende Resultate erhalten, die in Abbildung 16 und Abbildung 17 grafisch dargestellt sind:

- 1) Die Erstellung einer Kalibriergeraden mit einer Lösung der o.g. Zusammensetzung ist möglich.
- 2) Das Absorptionsmaximum unter den in 1) genannten Bedingungen liegt bei 616 nm und wird drei Minuten nach Zugabe der konzentrierten Schwefelsäure erreicht.
- 3) DNS stört die Reaktion nicht, SPC und Polysorbat ergeben in den Mengen, in den sie in den zu untersuchenden Formulierungen vorliegen, eine merkliche Absorption. Dieser Effekt läßt sich jedoch durch Berücksichtigung entsprechender Mengen bei der Erstellung einer Kalibriergerade eliminieren.
- 4) Die Linearität unter diesen Bedingungen ist von 1 µg bis > 50 µg gegeben.

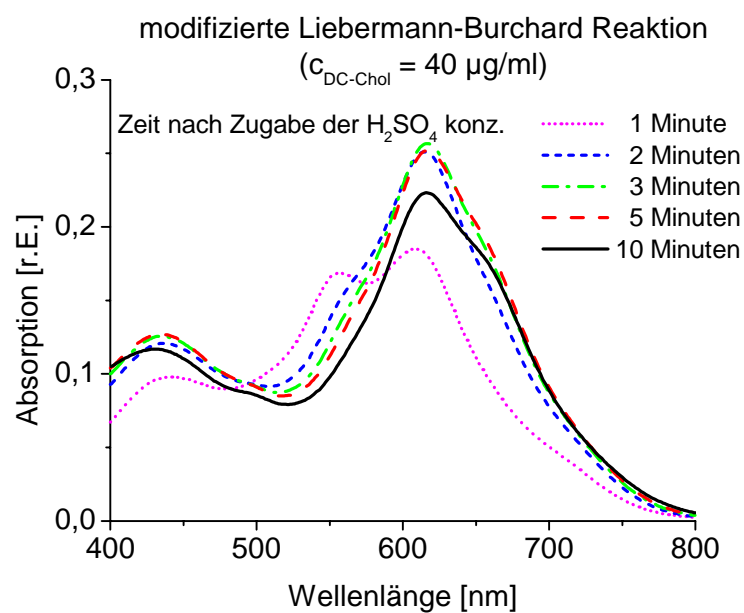


Abbildung 16: Zeitabhängigkeit der DC-Chol – Färbung

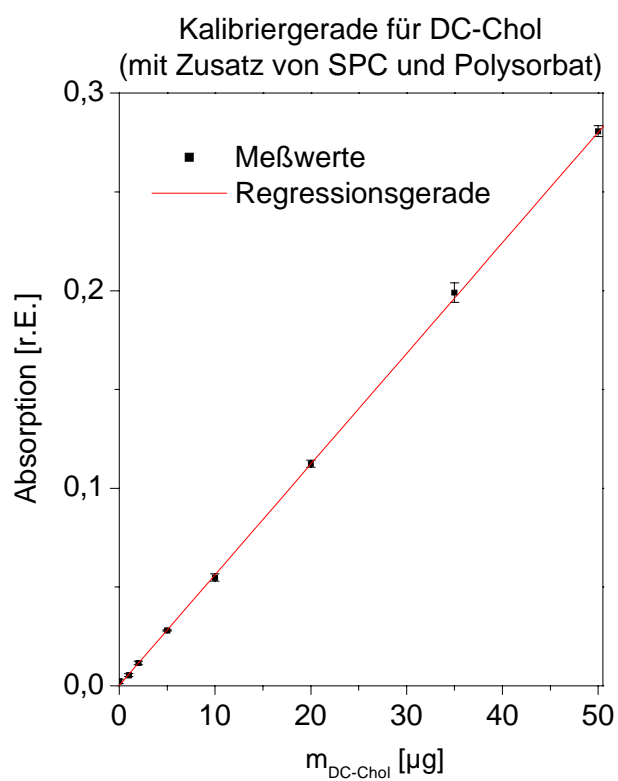


Abbildung 17: Kalibriergerade von DC-Chol (mit Zusatz von SPC und Polysorbat)

5.10.1.2.3 Standardmethode

Da der DC-Chol – Gehalt von SPC/Polysorbat/DC-Chol – Formulierungen mit unterschiedlichen Anteilen an SPC und Polysorbat (30/x/y und 30/24/z) ermittelt werden mußte, wurden zwei Kalibriergeraden erstellt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Vorlegen einer entsprechenden Menge Dichlormethan
- Zugabe der Stammlösungen von SPC, Polysorbat und DC-Chol
- Zugabe von 10 µl Phosphatpuffer, anschließend Zugabe von 400 µl Acetanhydrid
- Start der Reaktion durch Zugabe von 40 µl konzentrierter Schwefelsäure
- Vermessen des Ansatzes bei 616 nm drei Minuten nach der Zugabe der Schwefelsäure

Als Referenz diente für alle Ansätze eine Mischung aus 560 µl CH₂Cl₂, 400 µl Acetanhydrid und 40 µl konzentrierter Schwefelsäure.

5.10.1.3 Bestimmung des DNS – Gehaltes

Die Bestimmung des DNS-Gehaltes in der DNS-DC-Chol – Vesikelsuspension erfolgte fluorimetrisch. Dabei wurde der Anstieg der Fluoreszenz durch die Interkalation von Fluoreszenzfarbstoffen in die DNS genutzt. Gibt man zu einer wässrigen Lösung des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid DNS-Lösung, steigt die Fluoreszenz der Ethidiumbromidlösung stark an, da sich dieser Farbstoff in die DNS-Doppelhelix einlagert und damit stärker fluoresziert als ohne DNS.

Die Kalibriergerade wurde erstellt mit DC-Chol – Vesikeln (SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/4, TL = 1 %) und Kalbsthymus-DNS (< 1 kbp; c = 1 µg/µl). In Vorversuchen wurde die optimale Menge an Ethidiumbromidlösung zu 5 µl bestimmt, bei der Verwendung dieser Menge war der Unterschied zwischen der Fluoreszenz einer Lösung mit und ohne DNS am deutlichsten. Um festzustellen, ob/ wie weit die Anwesenheit der Vesikel-Bestandteile die Bestimmung der DNS beeinflussen, wurde folgendes Experiment durchgeführt:

1. 5 µl der Ethidiumbromid-Lösung wurden steigende Mengen DNS zugegeben.
2. 20 µl der DC-Chol-Vesikel wurden zusammen mit 5 µl der Ethidiumbromid-Stammlösung vorgelegt und steigende Mengen DNS zugegeben.

Die Anregungswellenlänge für die Fluoreszenzmessungen lag bei 518 nm, die Emissionswellenlänge bei 605 nm, der Extinktionsspalt war 2,5 nm breit, der Emissionsspalt 5 nm breit. Nach der Aufnahme der Kalibriergeraden wurden DNS-DC-Chol – Vesikel (SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/4) mit 1 % und 10 % Gesamtlipidgehalt vor und nach der Passage von 30 nm Poren bei verschiedenen Drücken vermessen.

5.11 *In vitro* Experimente mit Zellkulturen (HEK-Zellen)

Nach der physikochemischen Charakterisierung der DNS-Lipidvesikel war zu untersuchen, ob die Vesikel auch in der Lage sind, Zellen *in vitro* zu transfizieren, bevor sie *in vivo* an muriner Haut getestet wurden. Um die *in vitro* Transfektion zu testen, wurden HEK-Zellen mit ausgewählten DNS-DC-Chol – Formulierungen transfiziert.

Untersucht wurden nur Ansätze mit SPC, Polysorbat und DC-Chol, nicht jedoch flexible CTAB-Vesikel, da diese bereits in der physikochemischen Charakterisierung ungünstige Eigenschaften aufwiesen (schnelles Größenwachstum bereits nach kurzer Zeit). Das grundsätzliche Vorgehen bei den *in vitro* Experimenten war folgendes:

In jedes Loch der verwendeten 24-Loch-Platten wurde ein rundes Glasplättchen gelegt, das zuvor mit Polylysin beschichtet wurde. Durch das Beschichten mit Polylysin ist gewährleistet, daß die ausgesäten Zellen gut an den Glasplättchen anwachsen können und man die Plättchen zum Auszählen der Zellen direkt unter das Mikroskop legen kann. Einen Tag nach dem Aus säen von etwa 50.000 Zellen der Zelllinie HEK 293 in jedes Loch der 24-Loch-Platten wurden die zu testenden Formulierungen (s.u.) zupipettiert und einen Tag später wurden die Glasplättchen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Die zu testenden Formulierungen wurden folgendermaßen hergestellt: In je vier Löcher der 24 Loch-Platte wurden dieselben Formulierungen gegeben; pro Platte wurde jeweils eine der sechs Reihen für die Negativ-, eine Reihe für die Positivkontrolle mit dem Transfektionsreagenz Fugene[®] und die verbleibenden vier Reihen für die vier verwendeten Gesamtlipidgehalte verwendet, so daß für die gesamte unten skizzierte Versuchsreihe 18 Platten verwendet wurden. Die Lipidsuspensionen wurden in 500 µl Eppendorf-Gefäße vorgelegt und direkt nach dem Zupipettieren der DNS für je 30 Sekunden kräftig gevortext. Da das Verhältnis von Lipidsuspension zu DNS bei den einzelnen Platten konstant gehalten wurde, kam bei der Verwendung von Lipidsuspensionen mit einem niedrigeren Gesamtlipidgehalt eine entsprechend größere Menge zum Einsatz. Der angegebene Gesamtlipidgehalt bezieht sich demnach nur auf den Zeitpunkt unmittelbar vor der Zugabe der DNS zu den Lipidsuspensionen und weicht umso mehr vom tatsächlichen Gehalt ab, je höher er ist. Nach dem Mischen von Lipidsuspension und DNS wurden die Ansätze etwa 30 Minuten stehen gelassen, bevor die Mischungen mit Nährlösung (MEM-Puffer) auf 100 µl aufgefüllt und auf jedes der vier Löcher 25 µl des jeweiligen Ansatzes verteilt wurden. Bei den Ansätzen, deren Gesamtvolumen 100 µl überschritt, wurde der gesamte Ansatz auf die vier Löcher verteilt.

Zum besseren Verständnis der durchgeführten Reihe an Experimenten nochmals der Gesamtüberblick über die durchgeführten Experimente:

Formulierung	30/10/5 oder 30/10/8,4 oder 30/20/9,8																			
Ladungsverhältnis DNS : DC-Chol	1:11,8						1:5,9													
DNS	1,6 µg			0,4 µg			0,1 µg			1,6 µg			0,4 µg			0,1 µg				
TL [%]	10	5	1	0,2	10	5	1	0,2	10	5	1	0,2	10	5	1	0,2	10	5	1	0,2

Tabelle 2: Pipettierschema für die *in vitro* Experimente mit DC-Chol-DNS-Vesikeln

5.12 *In vivo* Experimente mit Mäusen

Zur Überprüfung der *in vivo* Transfektionseffizienz von mit DNS beladenen kationischen Vesikeln wurden nur Vesikel aus der DC-Chol-Reihe gewählt. Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Gewebe war die Haut von NMRI – Mäusen, die zu detektierenden fluoreszierenden Substanzen waren:

- die Lipidvesikel (SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/4 bzw. 30/24/3 und 30/24/6)
- die verwendete DNS (Plasmid-DNS für GFP, CFP bzw. red-FP)
- das exprimierte Protein (verschiedenfarbige fluoreszierende Proteine)

Die verwendeten DC-Chol-Vesikel wurden mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-DHPE markiert. Dazu wurde den flexiblen Vesikeln bei der Herstellung mittels Filmmethode Rhodamin-DHPE zugesetzt, wobei die Vesikel der Zusammensetzung 30/10/4 einen Gesamtlipidgehalt von 5 % aufwiesen, die später hergestellten Vesikel der Zusammensetzung 30/24/3 und 30/24/6 einen Gesamtlipidgehalt von 10 %. Die Vesikel der Zusammensetzung 30/10/4 enthielten 1 % [mol/ mol], die Lipidvesikel mit der Zusammensetzung 30/24/3 und 30/24/6 nur 0,07 % [mol/mol] des Fluoreszenzmarkers, jeweils bezogen auf den SPC – Anteil der Formulierung. Die niedrigere Konzentration dieses sehr intensiv färbenden Fluoreszenzfarbstoff erwies sich für die Mikroskopie der Biopsien als vorteilhafter. Dieser Farbstoff ist für den Einsatz der CLSM-Technik besonders geeignet, was bereits bei früheren Experimenten mit flexiblen Vesikeln gezeigt wurde [89].

Zur Markierung der Plasmid-DNS wurde der blaue Fluoreszenzfarbstoff Cy 5[®] verwendet. Um zu verhindern, daß die Fluoreszenzmarkierung der Plasmid-DNS deren Transfektionsfähigkeit beeinträchtigt, wurden nur jeweils 10 % (m/m) der eingesetzten Plasmid-DNS gemäß dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll mit dem Farbstoff markiert, die restlichen 90 % der verwendeten DNS waren unmarkiert. Durch die Markierung ist gewährleistet, daß die Lokalisation der DNS im Gewebe durch ihren fluoreszenzmarkierten Anteil mittels CLSM möglich ist, durch die Verwendung von unmarkierter DNS wird die grundsätzliche Transfektionsfähigkeit der Plasmid-DNS sichergestellt.

Bei den Experimenten wurden im Falle des Auftrags von reiner DNS oder von DNS-Vesikeln pro Applikationsstelle immer 40 µg DNS eingesetzt, die verwendete DNS codierte – je nach Experiment – für GFP oder CFP oder red-FP, also für einen grünen, cyanfarbenen oder roten Fluoreszenzfarbstoff. Dadurch konnte man – bei Anwesenheit der entsprechenden Farbe in den Hautzellen – feststellen, daß das jeweilige Protein exprimiert wurde.

Zur Herstellung der aufzutragenden Formulierungen wurden zuerst die Lipidvesikel in ein 500 µl Eppendorf-Gefäß pipettiert, anschließend die DNS. Direkt nach der Zugabe der DNS wurde das Reaktionsgefäß verschlossen und für 60 Sekunden kräftig gevortext. Die Herstellung der DNS-Vesikel erfolgte etwa zwei Stunden vor deren Verwendung *in vivo*.

Zur Durchführung der *in vivo* Experimente wurden weibliche NMRI-Mäuse mit einem Gewicht von 30 ± 3 g verwendet, die zu Versuchsbeginn narkotisiert wurden. Dazu wurde eine Mischung aus 6 ml physiologischer Kochsalzlösung, 1 ml Ketavet® 100 und 0,25 ml Rompun® hergestellt, von der pro Gramm Körpergewicht 10 µl intraperitoneal verabreicht wurden. Unmittelbar nach dem Eintreten der Narkose wurde das Fell an drei verschiedenen Stellen des Rückens (direkt im Genick, etwa in der Mitte des Rückens und in der Nähe des Schwanzes) mit einem Elektrorasierer komplett entfernt. Daß das Fell dabei nicht verletzt wurde, zeigte sich anhand der mikroskopischen Untersuchung der entnommenen Biopsien, die mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie untersucht wurden. Auf die kahlrasierten Stellen wurden dann die Formulierungen auf eine Fläche von jeweils 2-3 cm² pipettiert bzw. *intradermal* injiziert. Eine erfolgreiche intradermale Injektion einer Formulierung war an der Bildung einer Blase direkt unter der Hautoberfläche zu erkennen, d.h. es lösten sich in diesem Fall Dermis und Epidermis voneinander. Um das Eintrocknen der aufgetragenen Formulierungen zu beschleunigen und um eine Unterkühlung der Tiere zu verhindern, wurden die narkotisierten Tiere während des Eintrocknens der Formulierungen unter eine Infrarotlampe gesetzt. Während der 60 – 90 Minuten dauernden Narkose konnten die aufgetragenen Suspensionen soweit eintrocknen, daß die DNS-Vesikel ausreichend tief in die Haut penetrieren. Das Putzverhalten der Tiere nach dem Erwachen aus der Narkose, also die eventuelle Säuberung der Auftragsstelle, hatte daher keinen Einfluß auf das Versuchsergebnis.

Nach dem kompletten Eintrocknen der aufgetragenen Suspensionen wurden die Mäuse für etwa 42 Stunden in Einzelkäfigen gehalten. Nach dieser Zeit wurden die Tiere mittels einer Überdosis an Kohlendioxid-Gas euthanasiert. Unmittelbar nach Eintritt des Todes der Tiere wurden die Applikationsstellen gründlich mit einem feuchten Papiertuch gesäubert und erneut sorgfältig rasiert, um die während der 42 Stunden nachgewachsenen Haare möglichst vollständig zu entfernen. Nachdem diese Haare, die in der nachfolgenden mikroskopischen Untersuchung der Präparate stark gestört hätten, ganz entfernt waren, wurden mit einer 3 mm Biopsiesterile ein bis zwei Gewebeproben pro Applikationsstelle entnommen. Diese wurden direkt auf einen Objektträger gelegt und mit einem Deckgläschen abgedeckt, welches an allen vier Seiten luftdicht mit Tesafilm auf dem Objektträger fixiert wurde. Dadurch ließ sich ein Austrocknen des Präparats bis zu dessen Untersuchung verhindern.

5.13 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Mit der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) zur Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe in den entnommenen Biopsien wurde ein Verfahren gewählt, das eine gleichzeitige Lokalisation verschiedener fluoreszierender Substanzen in Geweben ermöglicht, ohne daß das Gewebe bei der Probenaufbereitung oder während der Detektion verändert wird.

Mit Hilfe der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie lassen sich mikroskopische Objekte nicht-destruktiv in sehr dünne optische Schichten „schneiden“ und dreidimensional darstellen. Die CLSM ist ein recht neues lichtmikroskopisches bildgebendes Verfahren, das von Marvin Minsky erfunden und 1980 von Petran und Boyde eingeführt wurde [110]. Es hat v.a. im biologischen Bereich weite Anwendung gefunden und funktioniert folgendermaßen:

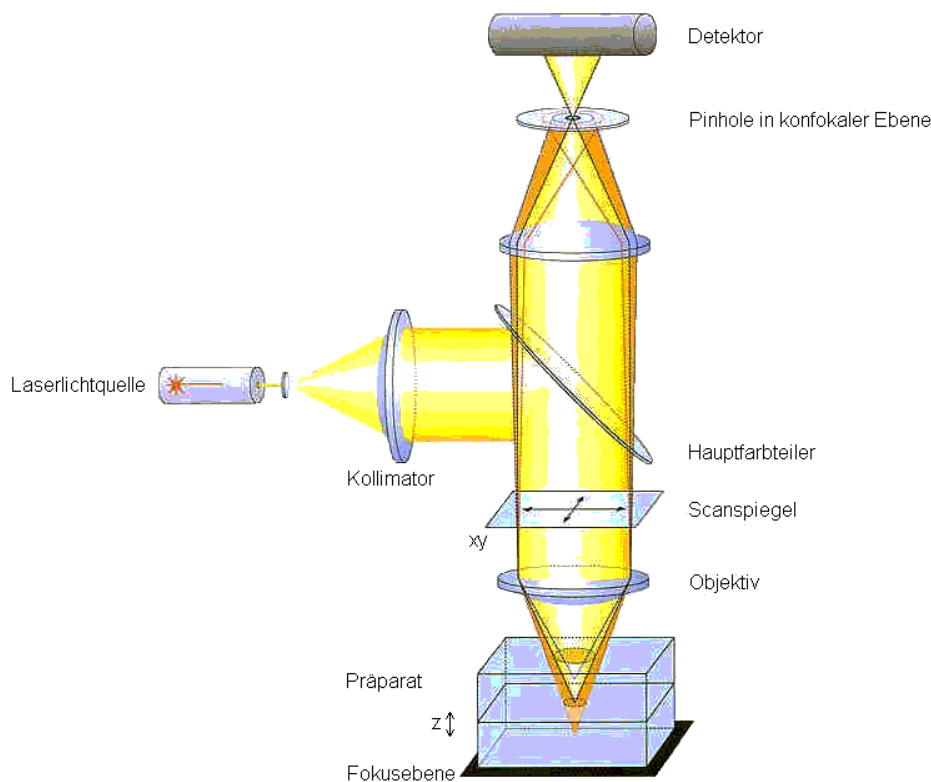


Abbildung 18: Strahlengang im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (nach [111])

Ein Laserstrahl wird durch eine Optik so aufgeweitet, daß er nach dem Passieren des Kollimators als *paralleles* Strahlenbündel von einigen mm Durchmesser auf den Hauptfarbteiler trifft. Das Strahlenbündel wird – ähnlich wie beim Fernseher – schrittweise in der x- und in der y-Richtung abgelenkt, bevor es durch das Objektiv des Mikroskops gelangt. Dieses bildet den parallelen Strahl in den Brennpunkt des zu untersuchenden Präparats ab. Das Fluoreszenzlicht, das vom Präparat emittiert wird, ist längerwellig als das eingestrahlte Licht und gelangt

durch die Objektivlinse zurück zum Hauptfarbteiler. Da dieser nur für Licht, das längerwellig ist als die verwendete Anregungswellenlänge, durchlässig ist, kann das reflektierte Licht den Hauptfarbteiler passieren und wird durch eine Zwischenoptik auf einer kleinen Lochblende (Pinhole) gebündelt. Diese Lochblende ist so angeordnet, dass sie nur Licht aus der gerade fokussierten Ebene durchlässt. Die Informationen aus der fokussierten Ebene werden durch einen lichtempfindlichen Detektor (Fotomultiplier), der hinter der Lochblende angeordnet ist, gesammelt; dieser wandelt das einfallende Licht in einen zur Intensität proportionalen Strom um, der auf elektronischem Weg erfasst und als Bilddaten abgespeichert wird. Mit Hilfe eines Computers, der die Bilddaten der einzelnen Ebenen aufzeichnet, lässt sich aus diesen Einzelschnitten ein dreidimensionales Gesamtbild rekonstruieren.

Da das Präparat auch unterhalb und oberhalb der Fokusebene leuchtet, ist es notwendig, durch apparative Bedingungen dafür zu sorgen, dass das auf das Objekt einfallende und das von ihm reflektierte Licht in *einer* Ebene sind (= konfokal), so dass das gesamte Licht, das nicht aus der fokussierten, sondern aus der darüber- oder darunterliegenden Ebene stammt, eliminiert wird.

Aufgrund des konfokalen Prinzips beläuft sich die Intensität, die mittels CLSM auf dem Bild zu sehen ist, auf nur 5 – 10 % der Intensität, die man mit einem normalen Fluoreszenzmikroskop erhält. Um diesen Effekt zumindest teilweise zu kompensieren, enthalten moderne CLS – Mikroskope zwei Komponenten: Der Einbau von Lasern (= „Light Amplification of Stimulated Emission of Radiation“) statt Quecksilberlampen sorgt für ein sehr helles Licht bei spezifischen Wellenlängen, die für die Anregung von Fluorochromen relevant sind. Außerdem dient der Fotomultiplier der Verstärkung des in verminderter Intensität empfangenen Signals. Die CLSM – Technik ist jedoch nicht geeignet, um schwach fluoreszierende Proben besser untersuchen zu können, da bei jedem Scannen die gesamte – ohnehin nur schwach fluoreszierende – Probe angeregt wird und das unerwünschte reflektierte Licht erst in der Lochblende ausgeblendet wird.

Im Rahmen dieser Arbeit standen an der GSF in Neuherberg ein konfokales Laser Scanning Mikroskop des Typs LSM 510 der Firma Zeiss Jena zur Verfügung, bei dem ein Argon – Laser mit der Anregungswellenlänge 488 nm sowie ein Helium/Neon – Laser mit den Wellenlängen 543 nm und 633 nm verwendet wurde. So war es möglich, bis zu drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zu detektieren. Als Objektiv wurde eine Linse mit 63facher Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 1,4 verwendet.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Fluoreszenz-Wellenlängen der zu untersuchenden Substanzen und die dafür zur Verfügung stehenden Laser und die eingesetzten Filter:

Substanz	Literaturwerte		zur Verfügung stehende ...	
	$\lambda_{\text{Exzitation}}$ [nm]	$\lambda_{\text{Emission}}$ [nm]	$\lambda_{\text{Exzitation}}$ [nm]	Filter
Rhodamin-DHPE	560	581	543	565 – 650 nm
Cy 5 [®]	649	670	633	> 650 nm
GFP	489	508	488	505 – 550 nm
CFP	434	477	458	480 – 520 nm
PdsRed1-N1	558	583	543	565 – 650 nm

Tabelle 3: Fluoreszenzwellenlängen der zu detektierenden Substanzen

Die mikroskopische Beobachtung der entnommenen Biopsien fand etwa 2 Stunden nach deren Präparation statt, so daß morphologische Veränderungen der Proben, die während einer längeren Lagerung auftreten könnten, auszuschließen sind.

6 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

6.1 Kritische Mizellbildungskonzentration der verwendeten Substanzen

Die Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) ist wichtig, um abschätzen zu können, welche Menge des zugegebenen Detergens sich im Lösungsmittel befindet bzw. wieviel davon sich in der Vesikelmembran aufhält und damit zur Flexibilität der Vesikel beiträgt. Bis zum Erreichen der CMC liegt ein Detergens, das man einer Vesikelsuspension zugibt, vorwiegend in Form von in Wasser gelösten Monomeren vor. Wenn die CMC überschritten wird, werden die Detergensmoleküle vollständig in die Vesikelmembran eingebaut und tragen dadurch zur Flexibilität der Vesikel bei. Die CMC von Phospholipiden liegt im Bereich von ca. 10^{-7} bis 10^{-12} M, die von Detergentien ist aufgrund ihrer besseren Wasserlöslichkeit meistens um viele Zehnerpotenzen größer.

Die Konzentrationen und Meßwerte der CMC – Bestimmung des Detergens CTAB mit Hilfe des Farbstoffs DPH sind in Anhang 1 aufgeführt; die Auswertung ergibt folgendes Schaubild:

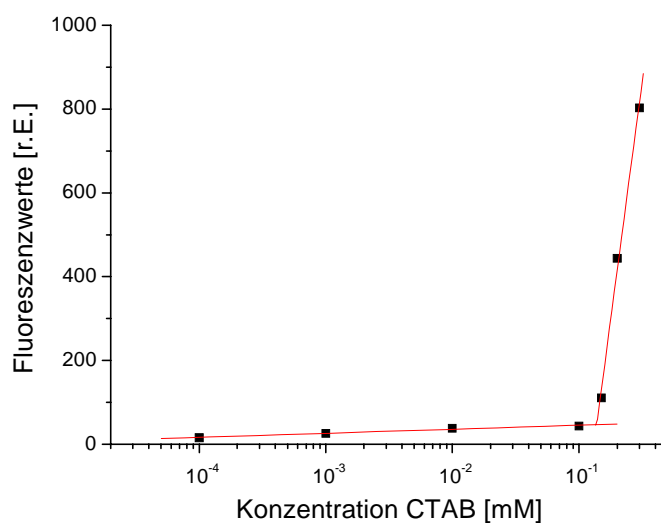


Abbildung 19: CMC – Bestimmung von CTAB in 50 mM Phosphatpuffer

Schneidet man die daraus resultierenden Geraden

$$1) \quad y = 11,49 \cdot \lg x + 61,17 \quad \text{sowie} \quad y = 2282,86 \cdot \lg x + 2009,34$$

und errechnet aus dem Schnittpunkt der beiden die CMC, ergibt sich für CTAB in 50 mM Phosphatpuffer eine CMC von ca. 0,14 mM. In der Literatur [102] wird die CMC von CTAB mit 1 mM angegeben. Der Unterschied um einen Faktor von etwa 7 dürfte dadurch zustande kommen, daß die CMC – Bestimmung aus der Literatur zwar bei derselben Temperatur (20 – 25 °C) stattfand wie die im Rahmen der Arbeit durchgeführte Messungen, eventuell aber in einem an-

deren Lösungsmittel bzw. bei einer anderen Ionenstärke bestimmt wurde. Neben der hier aufgeführten Bestimmung der CMC in 50 mM Phosphatpuffer wurde die CMC von CTAB auch in einer 250 mM Lösung sowie in einer 500 mM Lösung bestimmt, was zu Werten von 0,062 bzw. 0,049 mM führte. Wenn der in der Literatur genannte Wert in reinem Wasser als Lösungsmittel, also bei einer Ionenstärke von 0, bestimmt wurde, fällt der damit erhaltene CMC-Wert deutlich höher aus als bei der Verwendung von 50 mM Phosphatpuffer, was den Unterschied zwischen Literaturwert und experimentell bestimmtem Wert erklären würde.

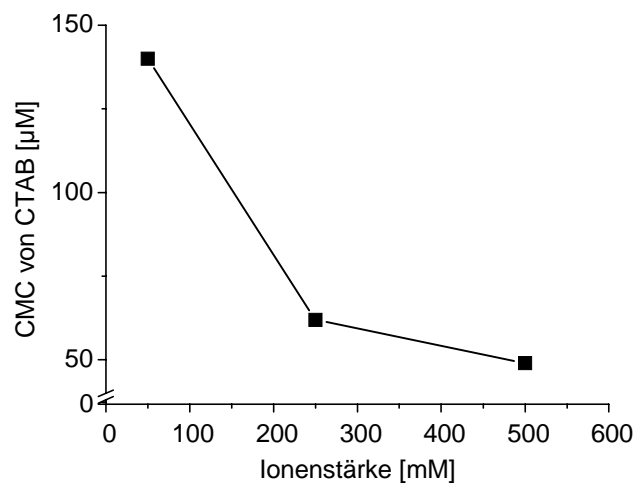


Abbildung 20: CMC von CTAB in Abhängigkeit von der Ionenstärke

Die Konzentrationen und Meßwerte der CMC – Bestimmung von DC-Chol mit Hilfe der Farbstoffe DPH und PNA sind in Anhang 2 aufgeführt. Die Auswertung ergibt folgendes Schaubild:

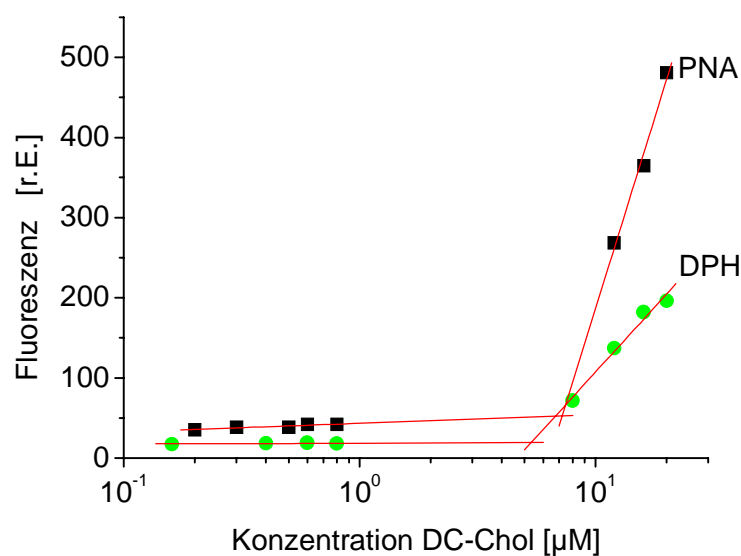


Abbildung 21: CMC – Bestimmung von DC-Chol mit DPH und PNA

Die Kalibriergeraden für die beiden Bestimmungen mit DPH (2a und 2b) lauten

$$2a \quad y = 7,58 \cdot \lg x + 24,88 \quad \text{sowie} \quad y = 415,31 \cdot \lg x - 282,63$$

$$2b \quad y = 1,05 \cdot \lg x + 18,65 \quad \text{sowie} \quad y = 322,51 \cdot \lg x - 215,03$$

Die Kalibriergeraden für die beiden Bestimmungen mit PNA (3a und 3b) lauten

$$3a \quad y = 33,75 \cdot \lg x + 63,89 \quad \text{sowie} \quad y = 453,53 \cdot \lg x - 304,14$$

$$3b \quad y = 10,75 \cdot \lg x + 43,40 \quad \text{sowie} \quad y = 947,71 \cdot \lg x - 761,00$$

Bei der CMC-Bestimmung von DC-Chol mit DPH ergeben sich Werte von 5,7 und 5,4 μM , PNA als Fluoreszenzfarbstoff liefert Werte von 7,5 und 7,2 μM , der Mittelwert dieser vier Werte liegt also bei etwa 6,4 μM . Vergleicht man die gemessenen CMC-Werte von jedem Fluoreszenzfarbstoff einzeln, so unterscheiden sich diese praktisch nicht, die Werte der beiden Farbstoffe untereinander differieren nur geringfügig. Trotz intensiver Literaturrecherche ließ sich für DC-Chol kein CMC-Wert finden. Da der errechnete Wert der Mittelwert aus vier Messungen ist, die kaum voneinander abweichen, kann man davon ausgehen, daß die CMC von DC-Chol mit der durchgeführten Untersuchung hinreichend genau bestimmt wurde.

Die CMC – Werte aller im Rahmen dieser Arbeit aufgeführten Substanzen sind in der folgenden Tabelle nochmals zusammengefaßt:

Stoff	CMC in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,5	Quelle
SPC	$2,0 \cdot 10^{-10} \text{ M}$	[101]
DC-Chol	$6,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	Versuch
Polysorbat 80	$1,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	[102]
CTAB	$1,4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	Versuch

Tabelle 4: CMC der in dieser Arbeit verwendeten Stoffe

Die CMC des Detergens CTAB, das als quartäres Amin permanent positiv geladen ist, ist etwa eine Zehnerpotenz höher als die CMC des nichtionischen Detergens Polysorbat. Die CMC des tertiären Amins DC-Chol liegt in derselben Größenordnung wie die CMC von Polysorbat, so daß Vesikel, die neben SPC noch diese beiden Komponenten enthalten, beim Verdünnen einer Vesikelsuspension etwa gleich viel Polysorbat und DC-Chol aus der Membran verlieren bzw. sich beim Aufkonzentrieren gleich viel der beiden Detergentien in der Membran anreichert.

Ob diese Aussage auch für Experimente gilt, bei denen mit DNS beladene SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel vorliegen, ist nicht sicher, da die Bindung von DNS an die Außenseite der DC-Chol – Vesikel erfolgt und dafür sorgen könnte, daß diese DNS als „Schutzschild“ dient, so daß

beim Verdünnen von DNS-Vesikeln mit Puffer kaum noch DC-Chol austritt. Abschließend noch zwei Beispiele, die den Einfluß der CMC veranschaulichen:

Verdünt man SPC-CTAB-Vesikel (1,5/1 [mol/mol]) mit einem Gesamtlipidgehalt von 10 % auf 0,2 %, wie dies für die Bestimmung der Adsorptionskinetik von DNS an CTAB-Vesikel durchgeführt wurde, so sind bei diesem niedrigen Gesamtlipidgehalt nur etwa 6 % weniger CTAB – Moleküle in der Membran als bei einem Gesamtlipidgehalt von 10 %. Dies zeigt, daß trotz der relativ hohen CMC von CTAB bei einer bis zu 50 fachen Verdünnung der 10 %igen Vesikelsuspension keine nennenswerte Änderung der Trägerzusammensetzung auftritt.

Geht man von SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikeln der Zusammensetzung 30/10/4 ([mol/ mol/ mol]) und einer Vesikelsuspension mit 10 % Gesamtlipidgehalt aus, so sind aufgrund der CMC von DC-Chol nur etwa 0,06 % nicht in die Membran eingebaut. Selbst bei einer Verdünnung von 1:100, wie sie bei der Partikelgrößenbestimmung auftritt, liegt der Fehler zwischen eingewogener Menge und tatsächlich in der Membran befindlicher Menge DC-Chol aufgrund der niedrigen CMC nur bei etwa 6 %.

Die Aussage über die Vesikelzusammensetzung bei *in vivo* Experimenten wird erschwert durch die Tatsache, daß die CMC von der Ionenstärke abhängt (s.o.), d.h. beim Eintrocknen einer Vesikelsuspension, also einer Erhöhung der Ionenstärke, sinkt die CMC von ionischen Detergentien.

6.2 Charakterisierung von kationischen Lipidvesikeln

6.2.1 SPC-CTAB – Vesikel

Zur Bestimmung des optimalen Verhältnisses von CTAB zu SPC wurde eine Solubilisierungskurve von SPC aufgenommen, d.h. einer konstanten Menge an SPC wurden steigende Mengen CTAB zugegeben und die Absorptionen dieser Mischungen bei 550 nm bestimmt. Die Zusammensetzung der Suspensionen und die dazugehörigen Meßwerte sind in Anhang 3 aufgeführt, in Abbildung 22 ist das Ergebnis grafisch dargestellt:

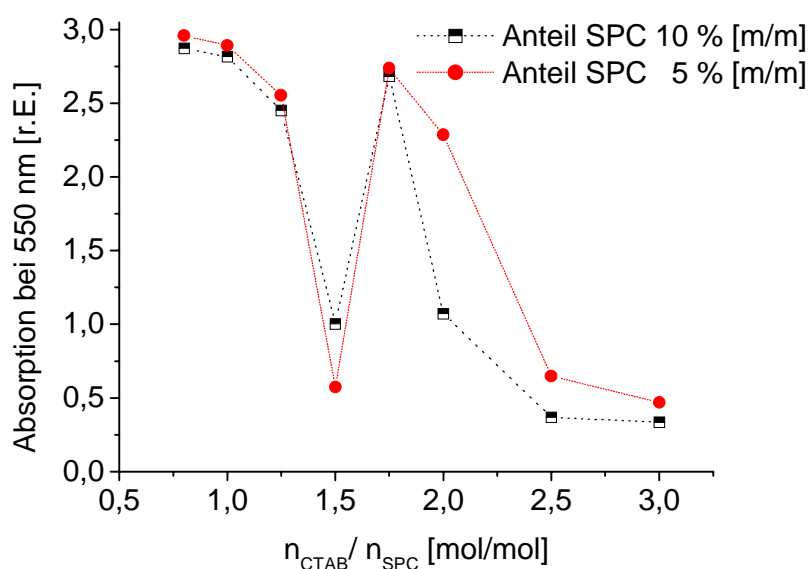


Abbildung 22: Solubilisierungskurve von SPC mit CTAB

Die Aufnahme dieser Kurve war v.a. deshalb wichtig, weil Teile dieser Kurve beim Eintrocknen der flexiblen Vesikel auf der Haut durchlaufen werden. Die Bestandteile der flexiblen Vesikel sind unterschiedlich wasserlöslich, was sich auch in ihrer CMC zeigt (s. 6.1). Die Detergentien neigen aufgrund ihrer guten Wasserlöslichkeit (hohe CMC) besonders stark dazu, beim Eintrocknen auf der Haut aus der Lösung heraus in die Membran zu wandern. Für die Phospholipide (niedrige CMC) ist dieser Effekt vernachlässigbar. Somit erhöht sich beim Eintrocknen einer Suspension aus flexiblen Vesikeln auf der Haut der Detergensgehalt in der Vesikelmembran. Dies führt im ungünstigsten Fall zu einer Solubilisierung und damit zu einer Zerstörung des Trägers, wodurch ein Wirkstofftransport nicht mehr möglich ist. Diese Solubilisierung ist auf alle Fälle zu vermeiden, d.h. die Detergentskonzentration bei der Herstellung muß so gewählt werden, daß die maximale Trübung der Suspension zum Zeitpunkt des kompletten Eintrocknens nicht überschritten wird.

Der grundsätzliche Verlauf dieser Kurve erklärt sich folgendermaßen: Ein Teil des Detergens wird in die Membran eingebaut; bedingt durch die zunehmende Membranfluktuation werden bei den entstandenen Mischvesikeln anfangs kleinere Vesikeldurchmesser gemessen als bei den reinen Phospholipidvesikeln, wodurch die Trübung der Suspension zunächst abnimmt. Mit steigendem Detergensgehalt wird die Membran immer flexibler und beginnt Ausläufer zu bilden, was die Trübung des Systems erhöht. Die Phospholipidmembran kann jedoch nur eine bestimmte Menge Detergensmoleküle aufnehmen. Wenn diese Grenze einmal erreicht ist, werden die Phospholipidmoleküle von den Detergensmolekülen solubilisiert, wodurch die Trübung des Systems stark abnimmt. Im konkreten Fall fällt die Absorption der untersuchten Suspensionen bei einem CTAB/SPC-Verhältnis von 0,8/1 bis 1,25/1 noch nicht deutlich ab. Der durch die Bildung von flexiblen Vesikeln verursachte Abfall der Absorption bei einem Verhältnis von 1,5/1 ist deutlich zu sehen; in diesem Bereich sind also die besonders deformierbaren Vesikel angesiedelt und das Verhältnis 1,5/1 wurde auch für alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente verwendet. Bei einem CTAB/SPC-Verhältnis von etwa 1,75/1 wird der Solubilisierungspunkt von flexiblen CTAB – Vesikeln erreicht bzw. überschritten. Der Abstand zwischen dem gewählten Verhältnis von 1,5/1 und dem solubilisierenden Verhältnis von etwa 1,75/1 ist relativ gering. Ob dieser Abstand ausreicht, damit die Vesikel bei einer *in vivo* – Applikation nicht solubilisieren, hängt davon ab, bis zu welchem Gesamtlipidgehalt die flexiblen Vesikel beim Eintrocknen aufkonzentriert werden, bevor sie mit der Penetration durch die Haut beginnen. Dies ist nur durch ein *in vivo* – Experiment zu bestimmen.

6.2.2 SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel

Für diese Vesikel wurde ein anderer Weg für die Formulierungsfindung gewählt: Dazu ging man von SPC/Polysorbat – Formulierungen im Bereich von 3/1 bis 1/1 (jeweils [mol/mol]) aus. Dann wurde überprüft, wieviel DC-Chol sich in die Membran einarbeiten läßt und welche Konsequenzen dies für die Flexibilität der Vesikel hat. Die Ergebnisse der Flexibilitätstests verschiedener SPC/Polysorbat/DC-Chol - Formulierungen sind in Kapitel 6.6.2 aufgeführt; die sich daran anschließende Analytik der Vesikel beschreibt Kapitel 6.6.3.2.

6.3 Aufbereitung der DNS

Die Gelelektrophoresen der verschiedenen Fragmentierungsverfahren wurden mit einer Kleinbildkamera aufgenommen, was zu schlecht scanbaren Bildern führte, weshalb diese Bilder nicht direkt für die Auswertung zu verwenden waren. Daher wurden die Ergebnisse anhand der Längenstandards graphisch aufgearbeitet, was zu folgendem Bild führte:

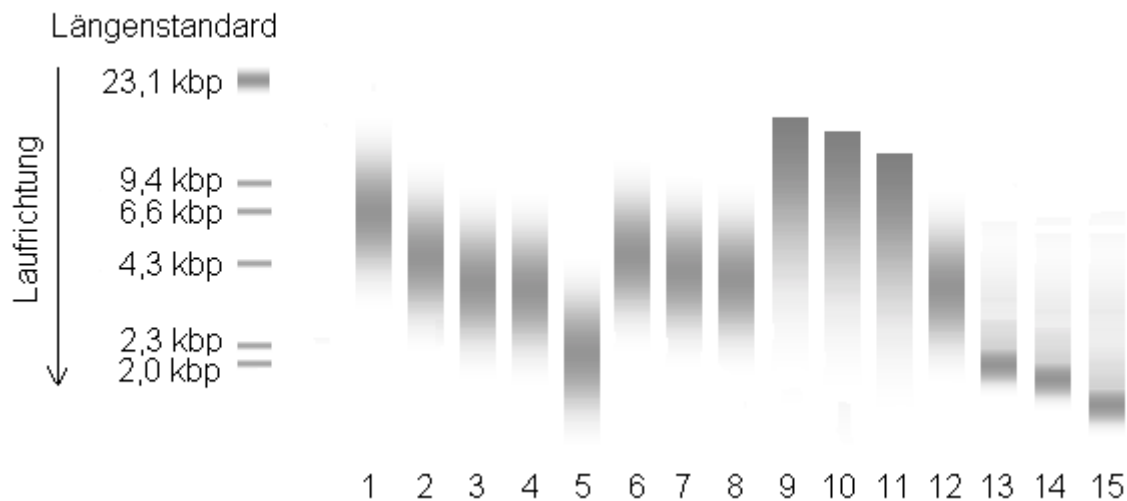


Abbildung 23: Effekte der verschiedenen DNS – Fragmentierungsverfahren

Auf den einzelnen Bahnen wurden folgende Proben aufgetragen:

1. 20 · Aufziehen mit der Hamilton-Spritze
2. 50 · Aufziehen mit der Hamilton-Spritze
3. 100 · Aufziehen mit der Hamilton-Spritze
4. 50 · Filtration durch 80 nm Polycarbonatfilter
5. 100 · Filtration durch 80 nm Polycarbonatfilter
6. 50 · Filtration durch 100 nm Polycarbonatfilter
7. 100 · Filtration durch 100 nm Polycarbonatfilter
8. 100 · Filtration durch 400 nm Polycarbonatfilter
9. 1 Sekunde Beschallen mit der Ultraschallspitze¹⁾
10. 2 Sekunden Beschallen mit der Ultraschallspitze
11. 3 Sekunden Beschallen mit der Ultraschallspitze²⁾
12. 5 Sekunden Beschallen mit der Ultraschallspitze
13. 10 Sekunden Beschallen mit der Ultraschallspitze
14. 20 Sekunden Beschallen mit der Ultraschallspitze
15. 30 Sekunden Beschallen mit der Ultraschallspitze³⁾

¹⁾ Diese DNS diente als „lange DNS“ zur Größenmessung von DC-Chol-Vesikeln

²⁾ Diese DNS wurde zur Titration der Vesikel mit DNS verwendet

³⁾ Diese DNS diente als „kurze DNS“ zur Größenmessung von DC-Chol-Vesikeln

Aus den verschiedenen Fragmentierungsmethoden der DNS können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

- Vortexen sowie das unterschiedlich häufige Aufziehen mit konventionellen Injektionsnadeln sind nicht dazu geeignet, die DNS in ausreichend kleine Stücke zu zerkleinern.
- Sowohl das Bearbeiten der DNS mit dem Handextruder und verschiedenen Filtern, als auch das mehrfache Aufziehen in eine Hamilton-Mikrospritze zerkleinern die DNS.
- Die resultierende DNS wird umso kleiner, je häufiger sie geschert wurde bzw. je kleiner die Poren der verwendeten Filter waren. So führte das 50fache Filtrieren der DNS durch 80 nm Polycarbonatfilter ebenso wie hundertmal Aufziehen mittels einer Hamiltonspritze zu DNS-Fragmenten von etwa 4,4 kbp Länge.
- Während sich die *Größe* der DNS auf besagte Weise verkleinern ließ, war die *Größenverteilung* der DNS durch die Behandlung mit Polycarbonatfiltern oder Hamiltonspritze nicht wesentlich zu verändern; sie liegt bei beiden Verfahren in der Größenordnung von etwa 3 – 4 kbp.
- Die Beschallung der DNS mit einer Ultraschallspitze hatte den größten Effekt auf die DNS-Größe und Größenverteilung: Kurze Beschallungszeiten (Nr. 9 – 11) führten zu großen Fragmenten mit einer breiten Verteilung. Bereits nach fünf Sekunden Beschallung (Nr. 12) erhielt man DNS, die in Größe und Größenverteilung der DNS entsprach, die man durch die Verwendung des Handextruders nach länger dauernder Behandlung erhalten hatte. Eine noch längere Beschallungszeit (Nr. 13 – 15) ergab zwar keine ganz scharfen Banden, da auch hier immer einige Fragmente mit > 2kbp enthalten waren, führte jedoch zu einer DNS, die kürzer und homogener verteilt war als bei allen anderen Verfahren.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß alle drei genannten Methoden, also Pressen durch eine Hamiltonspritze oder feine Filter bzw. Ultraschall, bei geeigneter Wahl der Bedingungen zu vergleichbaren Ergebnissen führten. Deutlich unterschiedlich ist jedoch die gewonnene Menge der DNS: bei der Verwendung der Hamiltonspritze bzw. von Handextruder und Anopore-Filtern waren mit einem erheblichen Zeitaufwand Volumina von maximal 0,25 – 1 ml zu gewinnen. Die Zerkleinerung der DNS mittels Ultraschallspitze ist deutlich schneller und ist auch für Probenvolumina bis zu 20 ml anwendbar.

Da die Beschallungsdauer sowie die Geometrie des Gefäßes, in dem die DNS gelöst ist, die Größe der erhaltenen DNS-Fragmente beeinflusst, mußte bei der Präparation jeder DNS-Charge zur Kontrolle ihrer Länge eine Gelelektrophorese durchgeführt werden. Rückblickend läßt sich aber sagen, daß sich die Länge der verwendeten DNS nicht wesentlich auf die Partikelgröße der mit DNS beladenen kationischen Lipidvesikel auswirkt. Die Qualität der mittels Ultraschall zerkleinerten DNS ist daher für die Zwecke der vorliegenden Arbeit ausreichend.

6.4 Messung der Adsorptionskinetik von DNS an kationische Vesikel

6.4.1 CTAB-SPC – Vesikel

Die Messung der Adsorptionskinetik von DNS an kationische Vesikel wurde durchgeführt, um Aufschluß darüber zu erhalten, wie lange die Anlagerung von DNS an die Lipidvesikel dauert und ob sich die Art der Zugabe, d.h. mehrere kleinere Mengen an DNS oder eine größere Menge DNS, auf das Endergebnis auswirkt. Welche Effekte die Anlagerung von DNS auf die physikochemischen Eigenschaften der entstehenden Komplexe aus DNS und kationischen Lipidvesikeln hat, wurde dadurch untersucht, daß nach der Zugabe unterschiedlicher Mengen DNS mit Hilfe des Titrators Proben gezogen und diese auf ihre Partikelgröße und Größenverteilung (s. 6.5.1) und ihre Flexibilität (s. 6.6.1) getestet wurden. Die Kinetikmessungen wurden mit einem Titrator und einer Phototrode durchgeführt, wobei Suspensionen zum Einsatz kamen, die einen Gesamtlipidgehalt von 0,2 % bzw. 0,6 % aufwiesen. Das hatte folgende Gründe:

Grundvoraussetzung für einen Transport flexibler, mit DNS beladener positiv geladener Vesikel durch die Haut ist, daß sich die Morphologie der Vesikel durch die Anlagerung der DNS nicht wesentlich ändert. Daher waren die Versuchsbedingungen so zu wählen, daß es bei der Zugabe von ausreichend wenig DNS zu kationischen Vesikeln gelingt, einschalige, mit DNS beladene Vesikel herzustellen. In der Literatur sind verschiedene morphologische Strukturen von DNS und kationischen Lipidvesikeln beschrieben, die je nach Untersuchungsmethode zu unterschiedlichen Strukturen der DNS-Lipidvesikel führen (z.B. [56] [112]). Bei den meisten Experimenten wurde durch die Wechselwirkung der kationischen Lipidvesikel mit anionischer DNS die Vesikelstruktur zum Teil stark verändert (s. Kapitel 4.1.2.4). Die exakten Bedingungen für den Erhalt der vesikulären Struktur auch nach der Anlagerung von DNS sind nicht bekannt. Grundsätzlich müßten intakte DNS-Vesikel jedoch durch die Verwendung von Vesikeln mit einem möglichst geringen Gesamtlipidgehalt sowie DNS einer ausreichend geringen Konzentration zu erreichen sein. Die verwendeten Konzentrationen der DNS und der flexiblen Vesikel sowie die Länge der DNS-Moleküle müssen so gewählt werden, daß ein DNS-Molekül nach seinem Erstkontakt mit einem Vesikel nur Gelegenheit hat, sich komplett um einen flexiblen Vesikel herum anzulagern und es keine Möglichkeit hat, Kontakt zu weiteren Vesikeln aufzunehmen. Das reduziert das Risiko, daß ein DNS-Molekül mehrere flexible Vesikel miteinander verbindet bzw. daß Vesikel fusionieren oder der Komplex aus DNS und Vesikel eine komplett neue Morphologie annimmt.

Ausgehend von diesen Überlegungen wurden folgende Ansätze getestet:

Ansatz 1+2: Vorlegen von 40 ml CTAB – Vesikeln (TL 0,2 %); dann Zugabe von 5x je 0,6 mg DNS, was folgenden Ladungsverhältnissen (DNS : kationisches Lipid) entspricht: 1:109 / 1:54,5 / 1:36,3 / 1:27,3 / 1:21,8.

Ansatz 3: Vorlegen von 40 ml CTAB – Vesikeln (TL 0,2 %); dann Zugabe von insgesamt 2,4 mg DNS in 2 Schritten zu je 1,2 mg DNS, um zu überprüfen, ob sich die Art der DNS-Zugabe ($4 \cdot 0,6$ mg bzw. $2 \cdot 1,2$ mg) auf die Kinetik auswirkt.

Ansatz 4: Vorlegen von 40 ml CTAB – Vesikeln (TL 0,6 %); dann Zugabe von insgesamt 3,6 mg DNS in 6 Schritten von je 0,6 mg (Ansatz 4), was einem Ladungsverhältnis von 1:327,3 bis 1:65,4 entspricht.

Die Meßwerte der vier Ansätze im Rahmen der Transmissionsmessung ohne weitere DNS-Zugabe sind in Anhang 4 und Anhang 5 angegeben. Abbildung 24 zeigt die Auswertung der Titration von Ansatz 1. Die Titration von Ansatz 2 war vom Kurvenverlauf vergleichbar, jedoch wurde während der Titration mehr Luft eingerührt, ebenso wie bei Ansatz 3. Ansatz 4 ist mit den anderen vergleichbar, die anfängliche Transmission dort betrug aufgrund des höheren Gesamtlipidgehaltes jedoch nur etwa 30 %.

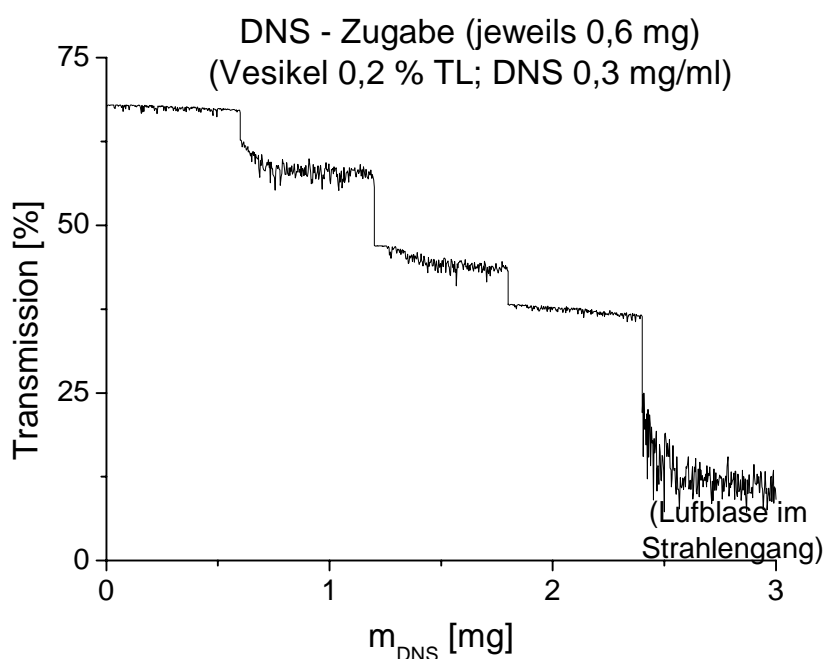


Abbildung 24: Titration einer CTAB – Vesikelsuspension mit DNS

Für die Ansätze 1 und 3, die beide einen Gesamtlipidgehalt von 0,2 % haben, sind die Änderungen der Transmission nach Zugabe von jeweils 0,6 mg DNS in Abbildung 25 grafisch dargestellt, die Werte für Ansatz 2 sind ähnlich zu denen von Ansatz 1 (s. Tabelle 5), so daß dieser Ansatz nicht extra dargestellt ist. Das entsprechende Ergebnis für den Gesamtlipidgehalt von 0,6 % (Ansatz 4) ist in Abbildung 27 dargestellt.

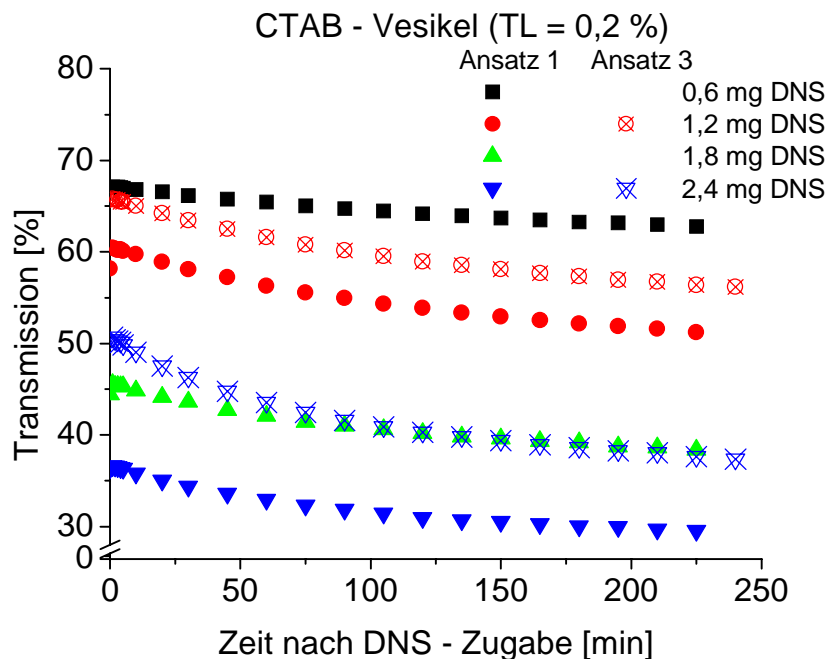


Abbildung 25: Kinetik der DNS – Adsorption an CTAB – Vesikel (TL 0,2 %)

Die Kurven in Abbildung 25 zeigen, daß die Abnahme der Transmission nicht mit dem Ende der Zugabe der DNS abgeschlossen ist. Das deutet darauf hin, daß sich nach der Adsorption von DNS an die flexiblen CTAB – Vesikel erst langsam ein Gleichgewicht einstellt. Dabei könnte es sich z.B. um Umlagerungen oder Fusionstendenzen handeln. Durch die Meßwerte läßt sich, wie in Abbildung 25 geschehen, eine Exponentialfunktion erster Ordnung legen. Diese hat die

Form:

$$y = A_1 \times e^{-\frac{x}{t_1}} + y_0$$

Die einzelnen Variablen haben dabei folgende Bedeutung:

- y = gemessene Transmission der DNS-Vesikelsuspension zum Zeitpunkt x
- A₁ = Differenz zwischen der Transmission der DNS-Vesikelsuspension zu Beginn des Experiments und im Gleichgewicht
- x = Zeit in Minuten ab dem Beobachtungsbeginn
- t₁ = Geschwindigkeitsrate
- y₀ = Wert der Transmission im Gleichgewicht

Die Geschwindigkeitsraten aus der Analyse der Daten der Abbildung 25 sind in der folgenden Tabelle angegeben:

Ansatz Nr.	Geschwindigkeitsrate t_1 [s ⁻¹] nach Zugabe von ... DNS				
	0,6 mg	1,2 mg	1,8 mg	2,4 mg	3,0 mg
1	172,9 ± 4,8	128,7 ± 2,9	107,7 ± 3,3	86,6 ± 2,1	- ¹⁾
2	- ²⁾	132,8 ± 5,7	111,9 ± 5,7	- ³⁾	84,0 ± 9,4
3	- ³⁾	129,5 ± 1,9	- ³⁾	83,2 ± 2,1	- ³⁾

Tabelle 5: Geschwindigkeitsraten der Anlagerung von DNS an CTAB – Vesikel (TL 0,2 %)

¹⁾ aufgrund des Einrührens von Luft nicht zu bestimmen

²⁾ aufgrund zu kurzer Beobachtungszeit (nur 1 Stunde) nicht zu bestimmen

³⁾ aufgrund der Versuchsanordnung nicht zu bestimmen

Die bei gleicher DNS-Menge erhaltenen Geschwindigkeitsraten in Tabelle 5 sind gut reproduzierbar und offensichtlich unabhängig von der Art der DNS-Zugabe. Es ist also für die Gleichgewichtseinstellung egal, ob man 4 · 0,6 mg DNS oder 2 · 1,2 mg DNS zu den Vesikeln zugibt. Außerdem fällt auf, daß die Geschwindigkeitsraten mit zunehmender DNS-Menge immer kleiner werden. Das deutet darauf hin, daß sich der Endzustand immer schneller einstellt, je mehr DNS verwendet wird. Die Unterschiede zwischen der Zugabe von 2,4 mg DNS bzw. 3,0 mg DNS sind dann auch nicht mehr signifikant. Trägt man in einem Diagramm die jeweiligen Konstanten logarithmisch über der DNS-Menge auf, so ergibt sich folgendes Bild:

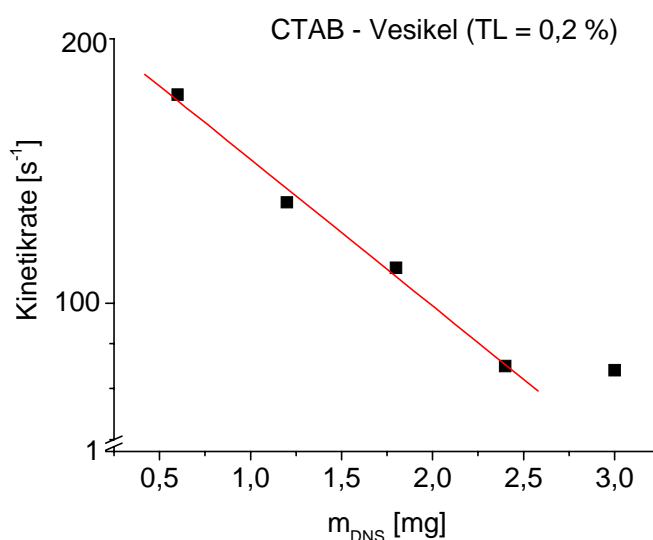


Abbildung 26: Geschwindigkeitsraten der DNS – Adsorption in Abhängigkeit der DNS – Menge

Dabei zeigt sich, daß die Geschwindigkeitsrate bis zu einem DNS-Gehalt von 2,4 mg DNS kontinuierlich abnimmt, anschließend scheint sie sich auf diesem Wert zu stabilisieren. Um zu überprüfen, ob dieser Endwert der Geschwindigkeitsrate vom Gesamtlipidgehalt der für die Titration verwendeten Vesikel abhängt, wurde Ansatz 4 gewählt, bei dem CTAB-Vesikel mit einem Gesamtlipidgehalt von 0,6 % vorgelegt und mit DNS einer Konzentration von 0,3 mg/ml titriert wurde. Das Schaubild der dazugehörigen Geschwindigkeitsraten sieht folgendermaßen aus:

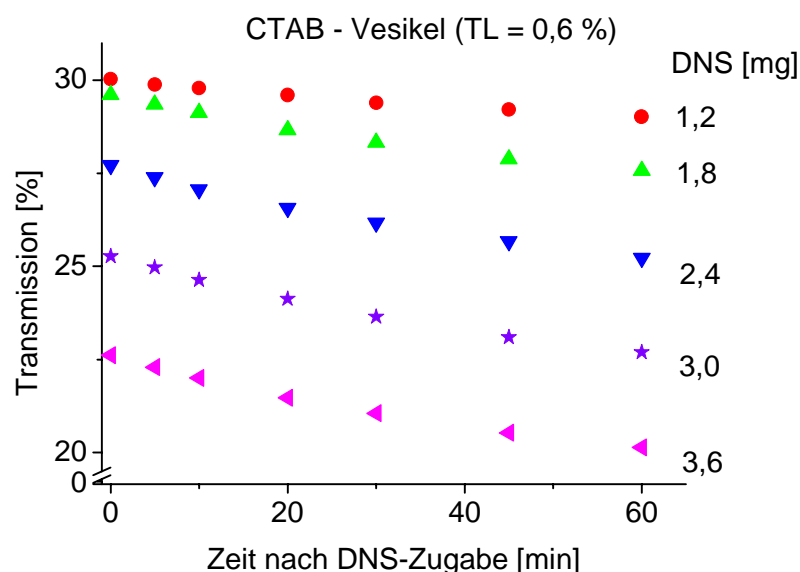


Abbildung 27: Kinetik der DNS – Adsorption an CTAB – Vesikel (TL 0,6 %)

Daraus ergebend sich folgende Geschwindigkeitsraten:

Zugabe von ... mg DNS	0,6	1,2	1,8	2,4	3,0	3,6
Geschwindigkeitsrate [s^{-1}]	¹⁾	$68,6 \pm 8,6$	$56,4 \pm 3,1$	$56,0 \pm 4,6$	$57,9 \pm 3,6$	$55,4 \pm 0,8$

Tabelle 6: Kinetik der Anlagerung von DNS an CTAB – Vesikel (TL 0,6 %)

¹⁾ nicht bestimmbar, da Luft in das System eingerührt wurde

Ab einer Menge von 1,8 mg DNS sind alle Werte gleich. Die charakteristische DNS-Adsorptionskinetik zeigt, daß sich das Gleichgewicht nach der DNS – Anlagerung an die CTAB-Vesikel bei einem Gesamtlipidgehalt von 0,6 % schneller einstellt als bei einem Gesamtlipidgehalt von 0,2 %. Trägt man in einem dreidimensionalen Diagramm die Kehrwerte der Geschwindigkeitsraten gegen die DNS-Mengen und den Gesamtlipidgehalt auf, so zeigt sich die Existenz eines solchen Plateaus deutlicher:

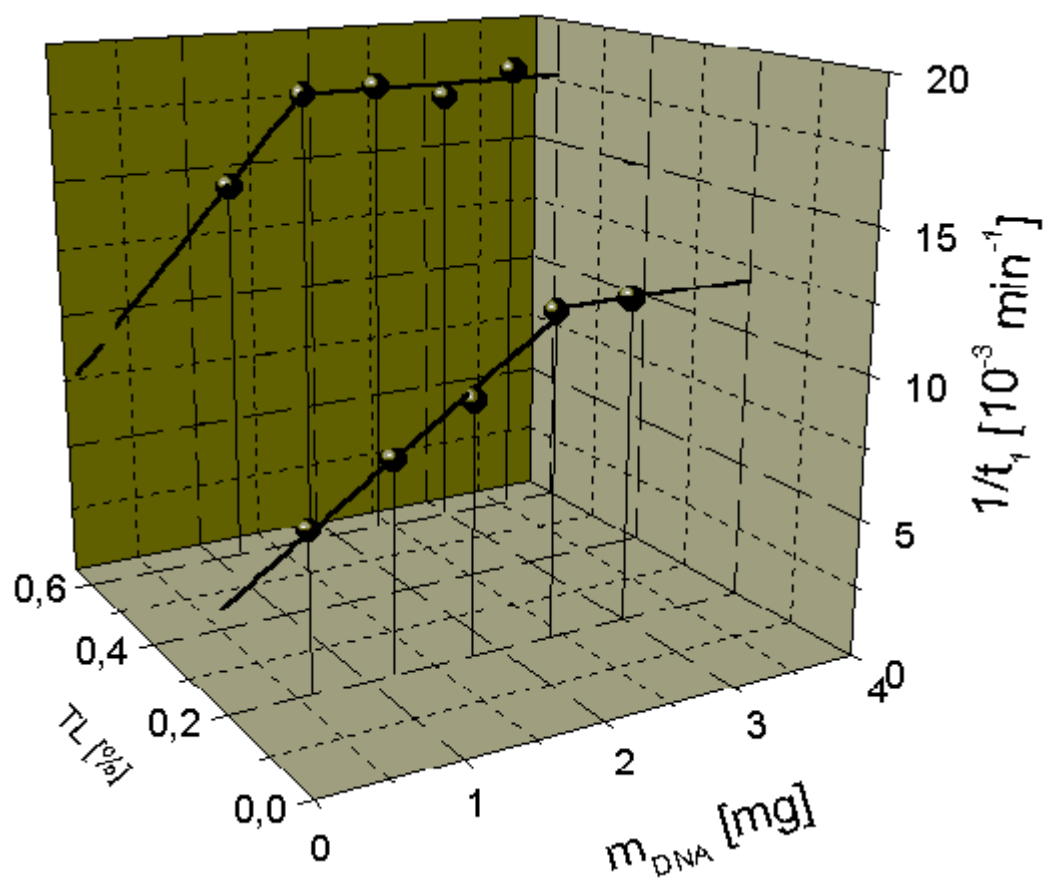


Abbildung 28: DNS-Adsorptionskinetik in Abhängigkeit von TL und DNS – Menge

6.4.2 SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel

Aufgrund der Schlußfolgerungen aus der DNS-Adsorptionskinetik – Messung bei flexiblen CTAB-Vesikeln wurden die SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel (30/10/5 [mol/mol/mol]) zunächst mit einem Gesamtlipidgehalt von 1 % hergestellt. Ausgehend von dieser Formulierung wurde die Vesikelsuspension mit Phosphatpuffer auf einen Gesamtlipidgehalt von 0,2 % verdünnt und dann schrittweise mit DNS titriert. Dabei nahm die Transmission der Vesikelsuspensionen nach wiederholter Zugabe von DNS ab, was bereits von der Titration der CTAB-Vesikel bekannt war. Bei der sich anschließenden Transmissionsmessung ohne weitere Zugabe von DNS war bei der Zugabe von 3x je 0,27 mg DNS (DNS:Lipid – Ladungsverhältnis 1:23,6 bis 1:7,9) jedoch während des gesamten Beobachtungszeitraums von 90 Minuten keine signifikante Abnahme der Transmission festzustellen. Erst nach der Zugabe von insgesamt 1,35 mg DNS, was einem DNS:Lipid – Ladungsverhältnis von 1:1,2 entspricht, war die von den CTAB-Vesikeln bekannte DNS-Adsorptioniskinetik zu beobachten.

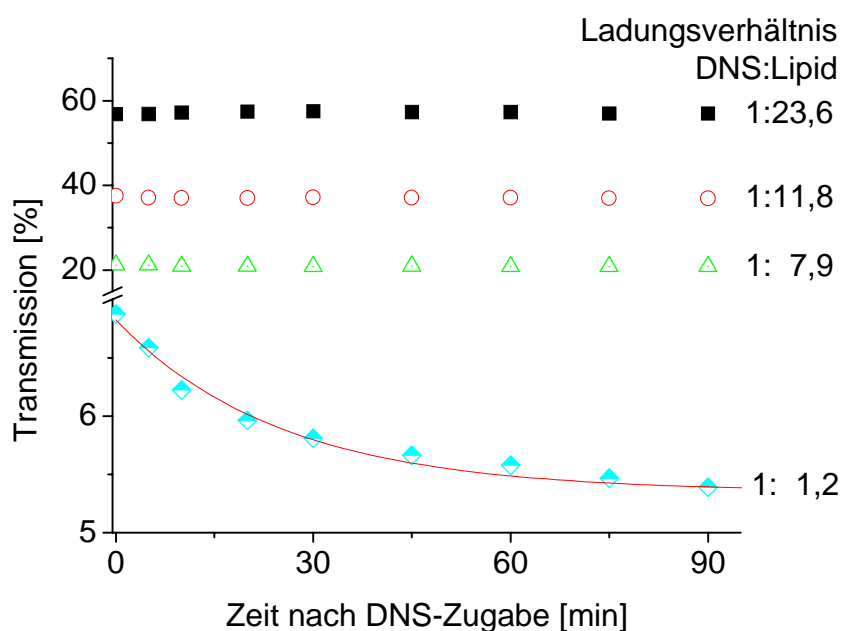


Abbildung 29: Kinetik der DNS – Adsorption an SPC-Polysorbat-DC-Chol-Vesikel (TL 0,2 %)

Für die grundsätzliche Vergleichbarkeit der Titration von CTAB – und von SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikeln sorgten die Titrationsbedingungen: der Gesamtlipidgehalt der beiden Vesikelsuspensionen war identisch, die Konzentrationen der verwendeten DNS-Lösungen annähernd gleich (0,3 mg/ml bzw. 0,25 mg/ml). Die Ladungsverhältnisse Lipid zu DNS waren für CTAB- und DC-Chol – Vesikel jedoch unterschiedlich: Nach der Zugabe von insgesamt 0,6 mg DNS zu

den flexiblen CTAB-Vesikeln lag das Ladungsverhältnis mit 109 : 1 deutlich über dem Wert für die SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel (11,8 : 1). Nimmt man an, daß sich das Gleichgewicht der DNS-Adsorption im Laufe einer Titration in Richtung eines Ladungsverhältnisses von 1:1 immer schneller einstellt, müßte sich das Gleichgewicht bei der Titration der DC-Chol – Vesikel sofort nach dem Ende der DNS-Zugabe eingestellt haben. Dem widerspricht jedoch Abbildung 29, da dort erst bei einem Ladungsverhältnis von nahezu 1:1 die charakteristische DNS-Adsorptionskinetik zu beobachten war, aber nicht bei den niedrigeren Ladungsverhältnissen (1:23,6 bis 1:7,9).

Die wahrscheinlichste Erklärung für die Tatsache, daß die Transmission der SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel ohne weitere Zugabe von DNS bei geringen DNS-Mengen nicht merklich abnimmt, ist die Anwesenheit von Polysorbat in der Doppelmembran. Dieses Detergens verhindert die Anlagerung von DNS an die kationischen Vesikel nicht vollständig, was die zunehmende Trübung der Vesikelsuspension bei DNS-Zugabe zeigt. Das Detergens könnte jedoch eine Art „mechanischer Puffer“ sein, der eine Fusion oder eine Umorganisation von DNS nach dem ersten Kontakt zwischen DNS und einem Vesikel verhindert. Ausgehend von dieser Beobachtung wurden SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel mit einem höheren TL – Gehalt entwickelt.

6.5 Größenmessung der Vesikel mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Durch die Vesikelgrößenmessung sollte festgestellt werden, ob die DNS-Vesikel-Komplexe sich von den reinen Vesikeln unterscheiden, sofort nach der DNS-Zugabe oder nach einer längeren Lagerung. Zur Bestimmung der Vesikelgröße wurde das Prinzip der PCS verwendet.

6.5.1 SPC-CTAB – Vesikel

Jeweils nach der Zugabe von 0,6 mg DNS zu 40 ml CTAB-Vesikeln wurden Proben gezogen. Die darin enthaltenen CTAB-DNS-Vesikel wurden auf die Größe (dicke Linien/Punkte) sowie den Polydispersitätsindex (dünne Linien/Punkte) untersucht. Anhang 6 enthält die Werte dieser Messungen, Abbildung 30 die grafische Auswertung der Vesikelgröße in Abhängigkeit von der Zeit:

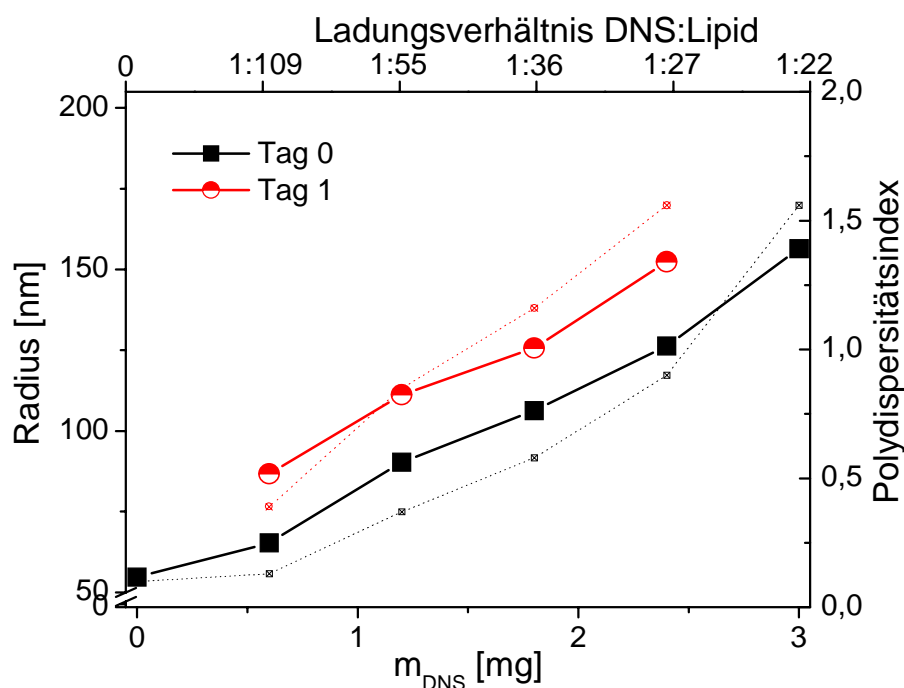


Abbildung 30: Größe und Polydispersitätsindex von CTAB-DNS – Vesikeln (TL = 0,2 %)

Man sieht folgendes:

- Radius und Polydispersitätsindex steigen mit zunehmender DNS-Menge an; das Wachstum ist annähernd linear.
- Radius und PI der mit DNS beladenen Vesikel sind in etwa proportional zueinander.
- Während der PI von CTAB-Vesikeln ohne DNS mit 0,1 noch einen akzeptablen Wert aufweist, wächst dieser spätestens nach der Zugabe von 1,2 mg (entspricht einem DNS:Lipid – Ladungsverhältnis von 1:54,5), auf einen sehr hohen Wert. Bereits einen Tag nach der DNS-Zugabe haben alle Vesikelsuspensionen einen viel zu hohen PI.
- PIs und Radien der DNS-CTAB-Vesikel sind bereits einen Tag nach dem Mischen von Vesikeln und DNS um etwa 20 % angestiegen.

Das rasche Anwachsen der PIs deutet auf eine eventuelle Fusion der mit DNS beladenen Vesikel hin. Das Partikelgrößenwachstum läßt ähnliche Schlußfolgerungen zu. Insgesamt bestätigt die Größenmessung der mit DNS beladenen CTAB-Vesikel die bereits bei der Bestimmung der Adsorptionskinetik gemachte Beobachtung, daß diese Träger aufgrund ihrer nicht steuerbaren Aggregations- bzw. Fusionsneigung für eine *in vivo* Anwendung nicht in Frage kommen.

6.5.2 SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel

Mit Vesikeln aus SPC/Polysorbat/DC-Chol in den molaren Verhältnissen 30/10/4 wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der der Einfluß folgender Parameter auf Größe und PI der DNS-Vesikel untersucht wurde:

- verschiedene Größen der verwendeten DNS (kurze, lange und Plasmid-DNS)
- verschiedene Gesamtlipidgehalte (10 %, 5 % und 1 % TL)
- verschiedene Mengen DNS (= Ladungsverhältnisse kationisches Lipid zu DNS)

Das Pipettierschema, das den untersuchten DNS – Vesikeln zugrunde liegt, ist für alle verwendeten DNS – Sorten (kurze, Plasmid- und lange DNS) identisch und in Anhang 7 angegeben. Durch die Zugabe von DNS wurden die Vesikel mit ursprünglich 10 % TL auf etwa 6,5 % verdünnt, bei den anderen TL – Gehalten fällt die Abnahme des TL – Gehaltes kaum noch ins Gewicht. Die DNS – Vesikel wurden bei 2 – 8 ° C gelagert und in Abständen von je einem Monat wurden sie bezüglich Größe und PI charakterisiert. Anhang 8 enthält die Werte der Messungen direkt nach dem Mischen, Anhang 9 die Meßwerte der mit Plasmid-DNS beladenen Vesikel zu verschiedenen Zeiten. Abbildung 31 und Abbildung 32 geben die Ergebnisse dieser Untersuchungen wieder. Da die Ergebnisse mit TL 5 % und TL 1 % mit den Resultaten der Meßreihe mit einem Gesamtlipidgehalt von 10 % vergleichbar sind, sind in den beiden Abbildungen nur die Ergebnisse mit 10 % Gesamtlipidgehalt dargestellt.

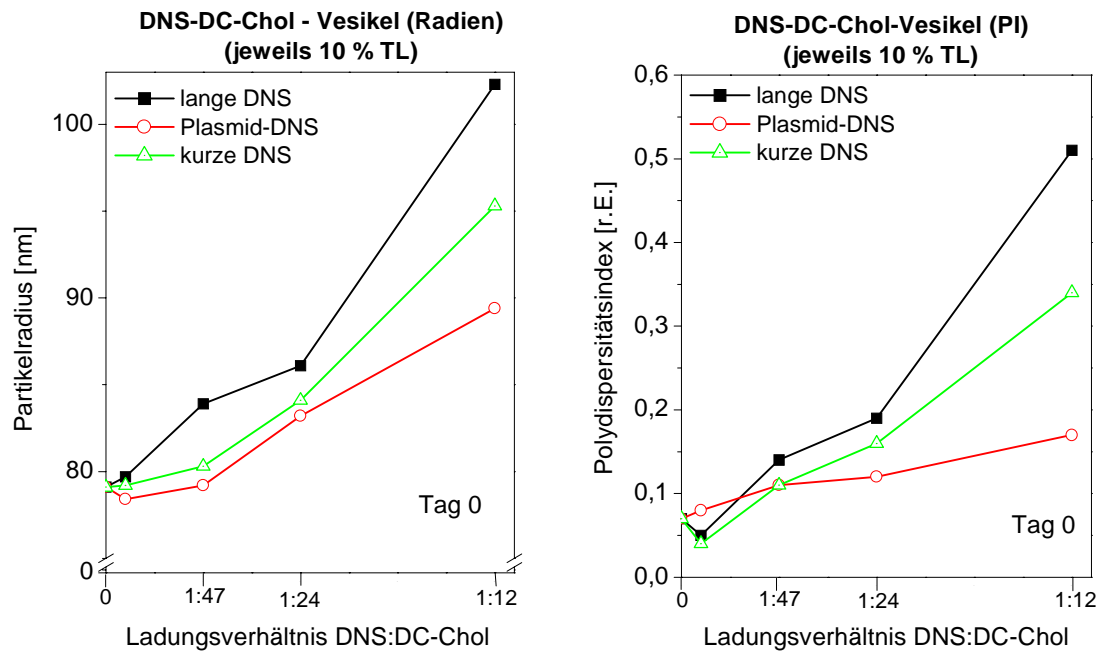


Abbildung 31: Radien und PI verschiedener DNS-DC-Chol – Vesikel direkt nach dem Mischen

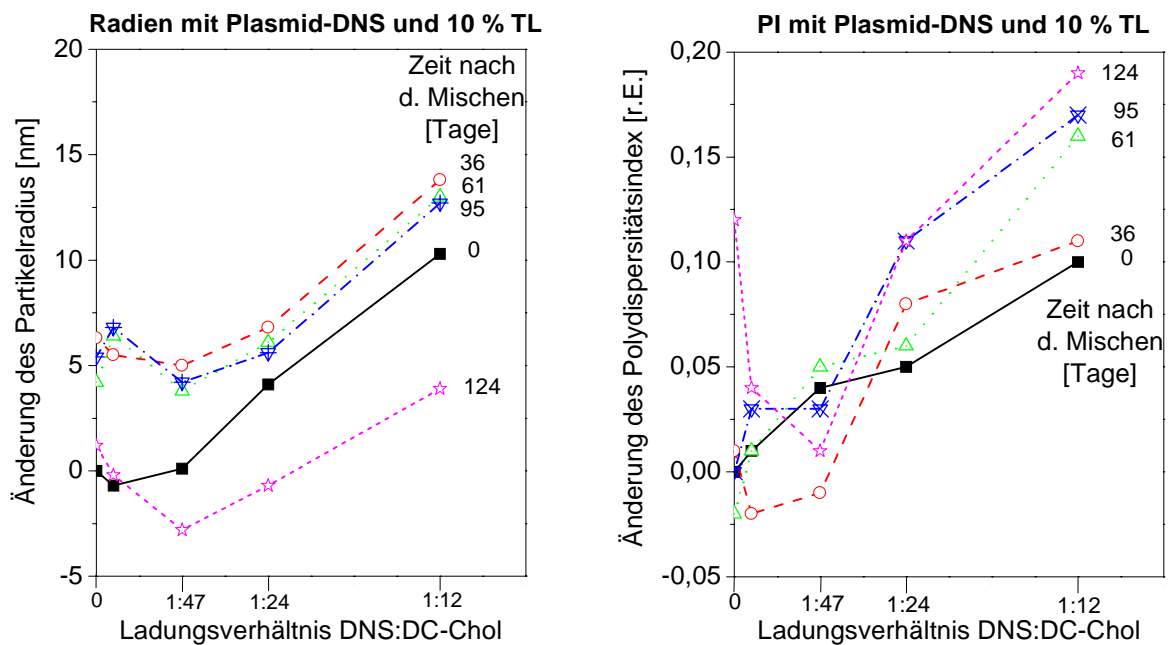


Abbildung 32: Änderung von Radius und PI von DC-Chol – Vesikel (TL 10 %) mit Plasmid – DNS

Die Auswertung dieser Meßreihen zeigt folgendes:

- Vesikelradius und Polydispersitätsindex stiegen beide mit zunehmender DNS-Menge, ähnlich wie im Fall von CTAB-DNS – Vesikeln.
- Der Radius der DNS beladenen Vesikel stieg im Beobachtungszeitraum nie über das $\sqrt{2}$ -fache des Anfangswertes an, so daß eine Fusion der mit DNS beladenen Vesikel ausgeschlossen werden kann.
- Die PIs stiegen zwar im Lauf der Beobachtungszeit und mit steigendem DNS-Anteil, waren jedoch im Vergleich zu den PIs, die beim Vermessen der mit DNS beladenen CTAB-Vesikel erhalten wurden, viel kleiner.
- Der Gesamtlipidgehalt der verwendeten Suspension hatte keinen wesentlichen Einfluß auf die resultierenden Radien/ PIs (s. Anhang 8).
- Kurze (< 1 kbp) und lange (> 12 kbp) lineare DNS führt zu größeren Radien/ PIs als Plasmid-DNS. Dies ist für die lange DNS nachvollziehbar. Die Vesikelvergrößerung durch kurze DNS im Vergleich zur Wirkung der Plasmid-DNS ist eventuell dadurch zu erklären, daß diese DNS durch die lange Beschallung zwar fast nur Bruchstücke < 1 kbp enthält, aufgrund der relativ breiten Bande jedoch auch einige wenige Bruchstücke, die größer sind (s. Abbildung 23, Bande 15); diese könnten dazu führen, daß Radien und PIs der mit kurzer DNS hergestellten Vesikel größer sind als bei den Vesikeln, die mit Plasmid-DNS versetzt wurden.
- Der Partikelradius nimmt bereits bei unbeladenen Vesikeln im Laufe der Zeit zu; einmal gebildete DNS-Vesikel wuchsen im Beobachtungszeitraum kaum noch.

Diese Beobachtungen lassen folgende Schlußfolgerung zu:

Vesikel aus SPC/Polysorbat/DC-Chol in den molaren Verhältnissen 30/10/4 sind in der Lage, DNS zu binden, wobei sich eine DNS-Zugabe bis zu einem Ladungsverhältnis von 1:47 (DNS: DC-Chol) über einen Zeitraum von mindestens 4 Monaten kaum auf die Partikelgröße auswirkt. Die geringste Zunahme in Partikelradius und Polydispersitätsindex tritt bei der Verwendung von Plasmid-DNS ein, was für *in vivo* Untersuchungen auch die einzig relevante DNS darstellt. Der Grund für das Partikelwachstum der nicht mit DNS beladenen Vesikel aus SPC, Polysorbat und DC-Chol wäre in weiteren Versuchen noch zu untersuchen.

An die Größenmessung der mit DNS beladenen Vesikel schloß sich ein Penetration Assay an. Die Resultate dieser Untersuchung ließen befürchten, daß die mit DNS beladenen Vesikel für die *in vivo* Applikation von DNS-Vesikeln zu rigide ist. Daher wurde zu einem späteren Zeitpunkt eine Formulierung mit gleicher Einwaage an DC-Chol, weniger SPC und mehr Polysorbat abgeleitet. Dabei wurde mit der Zusammensetzung 30/24/6 eine Kombination gewählt, die pro Volumeneinheit dieselbe Menge DC-Chol enthält wie die Formulierung 30/10/4. Die Formulie-

rung 30/24/3 enthielt nur halb so viel DNS wie die beiden o.g. Vesikel und sollte dadurch noch flexibler sein. Um sicher zu gehen, daß Vesikel, die kein kationisches Detergens enthalten, bei der Zugabe von DNS ihre Größe nicht ändern, wurde zur Kontrolle auch ein DC-Chol freier Ansatz (30/24/0) hergestellt. Direkt nach der Filtration wurden Größe und PI dieser Vesikel gemessen. Zwei Tage danach wurden die Radien und PIs dieser Vesikel erneut gemessen, was zu folgendem Ergebnis führte:

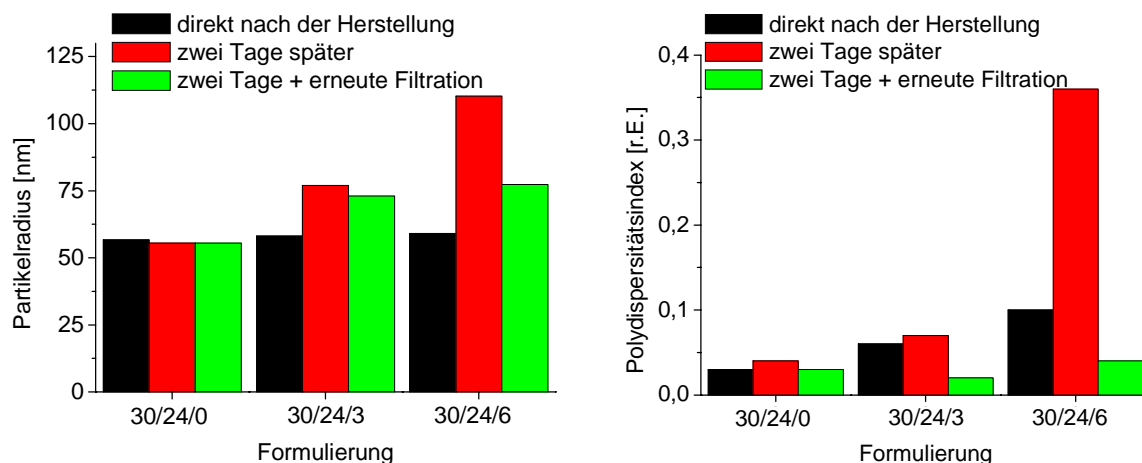


Abbildung 33: Radius und PI der 30/24/z – Formulierungen kurz nach der Herstellung

Dies zeigt, daß Partikelradius und PI beider DC-Chol-haltigen Formulierungen während der zwei Tage nach der Herstellungsfiltration zunahm. Bei der Formulierung 30/24/6 war bereits der anfängliche PI mit 0,08 etwas höher als bei den anderen beiden Vesikelsuspensionen. Bei der Formulierung 30/24/3 beschränkte sich das Ansteigen während der ersten zwei Tage im Wesentlichen auf den Radius. Die Änderungen ließen sich in beiden Fällen durch eine erneute Filtration wieder rückgängig machen, wie Abbildung 33 zeigt.

Nach diesen Messungen wurden allen drei Formulierungen unterschiedliche Mengen Plasmid-DNS zupipettiert und anschließend Radius und PI gemessen. Nach etwa 2 Monaten Lagerung dieser Vesikel bei 2 – 8 °C wurden diese Größen erneut gemessen. Dabei ergab sich folgendes:

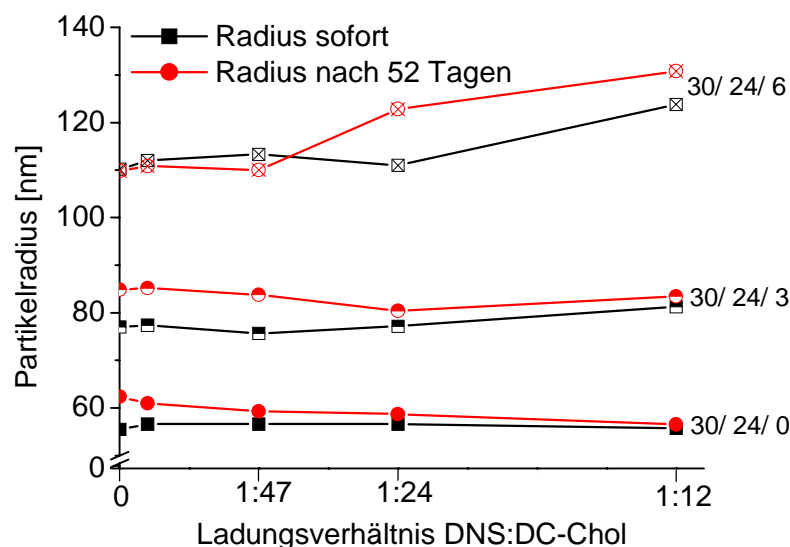


Abbildung 34: Partikelradien von SPC/Polysorbat/DC-Chol – Vesikeln verschiedener Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Zeit nach DNS-Zugabe

- Die zur Kontrolle hergestellten Vesikel ohne DC-Chol (30/24/0) zeigten wie erwartet auch bei der Zugabe von DNS keinerlei Zunahme in Partikelradius und PI, weder direkt nach dem Mischen, noch etwa 2 Monate später.
- Durch den bei den 30/24/z – Formulierungen erhöhten Anteil an Polysorbat fällt das Wachstum der DNS-Partikel mit steigender DNS-Menge weit weniger deutlich aus. Dies geht im Fall der Formulierung 30/24/3 sogar so weit, daß bei keinem der getesteten Ladungsverhältnisse ein Partikelwachstum nachzuweisen war, weder direkt nach der Herstellung, noch nach einer Lagerung von etwa zwei Monaten. Dies dürfte, wie bereits vermutet, daran liegen, daß die Verwendung einer größeren Menge Polysorbat ein Wachstum der DNS-Lipidvesikel noch stärker verhindert.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß die entwickelten Formulierungen 30/24/3 und 30/24/6 im Vergleich zur 30/10/4 – Zusammensetzung in Bezug auf das Wachstum von Partikelgröße und Polydispersitätsindex etwas schlechter abschneiden. Die Formulierung 30/24/3 weist bei akzeptablem PI selbst beim höchsten getesteten DNS:DC-Chol – Verhältnis kein nennenswertes Wachstum des Partikelradius auf. Diese Formulierung ist daher für *in vivo* Versuche gleich gut geeignet wie die zuvor entwickelte Formulierung 30/10/4. Aufgrund des weitgehend reversiblen Anwachsens von Partikelgröße und PI bei den reinen Vesikeln (s. Abbildung 33) wurden die Vesikel der Zusammensetzung 30/24/3 und 30/24/6 direkt vor den *in vivo* Versuchen so oft filtriert, bis der PI < 0,1 war.

6.6 Penetration Assay

Der Penetration Assay (PA) stellt eine Möglichkeit zur physikochemischen Charakterisierung von Vesikelsuspensionen dar und erlaubt Aussagen über die Flexibilität der getesteten Vesikelsuspensionen. Die entscheidenden Unterschiede zwischen diesem Modell und dem Verhalten flexibler Vesikel auf der Haut sind, daß beim Penetration Assay ein hydrostatischer Druck angelegt wird, sich die Konzentration und die Zusammensetzung der Vesikelsuspension während der Durchführung des Experiments nicht ändert und daß die Poren von Anfang an eine konstante Breite haben. Beim Eintrocknen auf der Haut hingegen ist die Hydrotaxis entscheidend; außerdem ändert sich die Konzentration der Trägersuspension während des Experiments, was aufgrund der CMC auch zu einer veränderten Zusammensetzung der Träger führt. Zudem öffnen sich die Poren in der Haut erst durch die Einwirkung von flexiblen Vesikeln. Aus diesem Grund sind Ergebnisse, die mit Hilfe des Penetration Assays gewonnen wurden, nicht auf die Verhältnisse für *in vivo* Versuche auf der Haut übertragbar.

6.6.1 SPC-CTAB – Vesikel

Für die Flexibilitätsmessung mit CTAB – Vesikeln wurden Suspensionen mit verschiedenen Gesamtlipidgehalten getestet. Da sich nur Vesikel mit demselben Gesamtlipidgehalt ungefähr vergleichen lassen, sind in der folgenden Abbildung nur die getesteten flexiblen CTAB – Vesikel mit 10 % TL sowie die entsprechenden nichtionischen bzw. anionischen flexiblen Vesikel dargestellt.

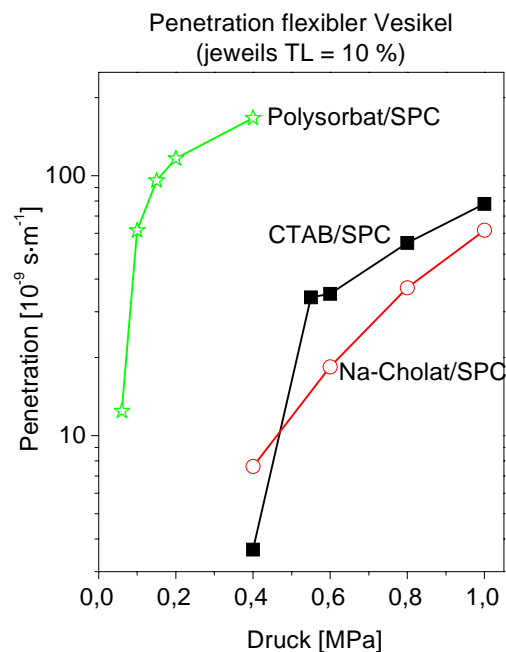


Abbildung 35: relative Penetrationsfähigkeit von CTAB – Vesikeln

Dabei stellte sich heraus, daß die kationischen und anionischen flexiblen Vesikel *in vitro* etwa die gleichen Penetrationseigenschaften haben, die nichtionischen Vesikel sind – wie die Linksverschiebung dieser Kurve zeigt – flexibler. Dies zeigt, daß die Herstellung von kationischen flexiblen Vesikeln grundsätzlich möglich ist.

Bevor die mit DNS beladenen CTAB – Vesikel dem Penetration Assay unterworfen wurden, mußte das Penetrationsverhalten einer reinen DNS-Lösung getestet werden. Dabei war beim Einsatz der üblicherweise verwendeten 30 nm Filter ein Verlust an DNS im Filtrat festzustellen. Erst der Einsatz eines Filters mit 50 nm Porendurchmesser erlaubte eine gute Passage der DNS-Lösung durch die Poren. Damit die Unterscheidung zu starren Liposomen weiterhin möglich war, wurden Vesikel gewählt, die deutlich größer sind als der Porendurchmesser. Dadurch ist sichergestellt, daß nur ausreichend verformbare Vesikel, nicht jedoch Liposomen penetrieren können [107]. Da die getesteten DNS-CTAB-Vesikel einen Durchmesser von etwa 180 nm aufwiesen, die Porengröße des verwendeten Filters jedoch nur 50 nm betrug, konnte der modifizierte Penetration Assay durchgeführt werden.

Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis eines Penetration-Assays von CTAB – Vesikeln mit einem Gesamtlipidgehalt von 0,2 % und 1,8 mg DNS.

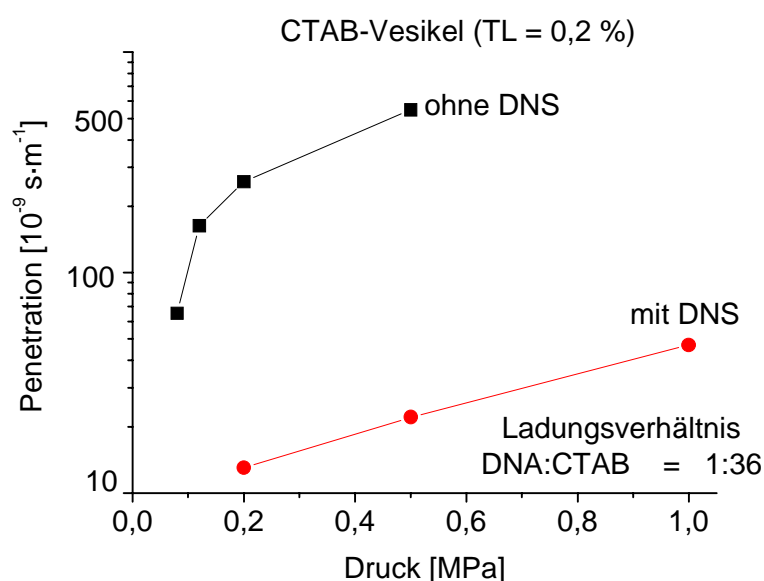


Abbildung 36: Penetration von CTAB – Vesikeln mit und ohne DNS

Die mit DNS beladenen Vesikel penetrieren etwa zwanzig Mal schlechter (Vergleich der Werte bei 0,2 MPa und 0,5 MPa). Dabei stellt sich die Frage, ob bzw. wieviel der Vesikel und der DNS bei der Passage der 50 nm Poren verloren gehen, was in Kapitel 6.6.3.1 im Rahmen der Analytik der beiden Bestandteile untersucht wird.

6.6.2 SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel

Bei der Messung der Adsorptionskinetik von DNS an flexible CTAB-Vesikel wurden diese von 10 % auf einen Gesamtlipidgehalt von 0,2 % bzw. 0,6 % verdünnt. Da selbst bei diesen geringen TL – Gehalten nach kurzer Zeit ein deutliches Partikelgrößenwachstum festzustellen war, was auf eine Fusion hindeutet, wurden die Vesikel aus SPC, Polysorbat und DC-Chol direkt, d.h. ohne einen Verdünnungsschritt, mit einem TL – Gehalt von 1 % hergestellt. Dadurch soll die Fusionsgefahr minimiert werden.

Die Ergebnisse des Penetration-Assays der vier Formulierungen aus SPC/Polysorbat/DC-Chol mit den Zusammensetzungen 30/10/5, 30/10/8,4, 30/20/8,4 und 30/20/9,8 sowie der Vergleichs-suspension ohne DC-Chol (SPC/Polysorbat 30/10) mit einem TL – Gehalt von 1 % sind in der folgenden Abbildung zu sehen. Alle Formulierungen wurden durch einen 30 nm Filter filtriert:

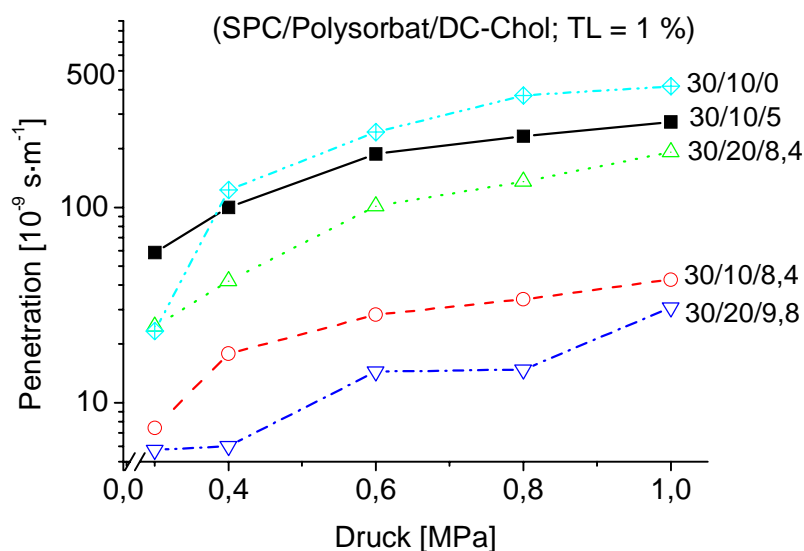


Abbildung 37: Penetration von DC-Chol – Vesikel unterschiedlicher Zusammensetzung

Bei der Durchführung des Penetration – Assays war festzustellen, daß die Flußrate der DC-Chol-haltigen Formulierungen während der Durchführung des Experiments abnahm. Dieser Effekt führte zu einem Filterkuchen aus glitzernden DC-Chol – Nadeln und war umso deutlicher, je mehr DC-Chol in der Formulierung enthalten war. Grundsätzlich kann eine abnehmende Flußrate bei der Filtration einer Vesikelsuspension mehrere Ursachen haben: zu steife Vesikel, eine nicht ausreichend monodisperse Verteilung, mehrschalige Vesikel, all dies sind Gründe, die zu einem Verstopfen der Poren und damit zur Abnahme der Flußrate führen. Eine nachträgliche Untersuchung ergab, daß die Menge DC-Chol, die sich in die Membran einlagern kann, begrenzt ist.

Vergleicht man die einzelnen Penetrationskurven miteinander, so stellt man fest, daß der Zusatz von DC-Chol die Membran versteift (Vergleich von Ansatz 30/10/0 mit 30/10/5 oder 30/10/5 mit 30/10/8,4 und 30/20/9,8). Die Verwendung von Polysorbat kompensiert diesen Effekt teilweise, wie die Formulierungen 30/10/8,4 und 30/20/8,4 zeigen. Im Vergleich zu den reinen Polysorbat – Vesikeln (SPC/Polysorbat 30/10), die als Kontrolle mit aufgeführt sind, haben alle hergestellten Ansätze eine geringere Penetration, der Einbau von DC-Chol in die Membran macht die DC-Chol-haltigen Vesikel also rigider.

Aufgrund der Ergebnisse der Größenmessung wurden zu einem späteren Zeitpunkt die Formulierungen mit der Zusammensetzung 30/10/4 sowie 30/24/3 und 30/24/6 [SPC/Polysorbat/DC-Chol] und einem Gesamtlipidgehalt von 10 % hergestellt und mit DNS kombiniert. Für die Durchführung *eines* Durchgangs beim Penetration Assays werden mindestens 5 ml Vesikelsuspension benötigt. Eine einigermaßen verlässliche Aussage bezüglich der Vesikelflexibilität läßt sich erst ab etwa drei Durchgängen treffen, was etwa 20 mg Plasmid-DNS notwendig macht. Anstelle eines Penetration Assays wurden daher jeweils nur 300 – 400 µl der o.g. Vesikelsuspensionen verwendet, denen DNS zupipettiert wurde. Diese DNS-Lipidkomplexe wurden in die Filterkerze gefüllt und unter Stickstoffdruck durch die Poren gepreßt. Die Proben vor und nach der Passage der Filter wurden gesammelt und auf die Bestandteile SPC, Polysorbat, DC-Chol und DNS analysiert (s. Kapitel 6.6.3.2).

6.6.3 Analytik der Vesikel

Die Analytik der verschiedenen Trägersysteme mit und ohne DNS war notwendig, um zu bestimmen, ob bzw. in welchem Umfang einzelne Vesikelbestandteile oder DNS nach der Filtration der jeweiligen Formulierung verlorengegangen sind. Zur Analytik der einzelnen Bestandteile wurden ausschließlich photometrische Verfahren verwendet, da diese mit einem geringen Zeitaufwand verbunden sind und eine ausreichend hohe Genauigkeit aufweisen.

6.6.3.1 SPC-CTAB – Vesikel

Die Herstellung und der Penetration-Assay von nicht mit DNS hergestellten flexiblen CTAB-Vesikeln wies keine Besonderheiten auf, weshalb für die reinen CTAB-Vesikel keine Analytikmethode entworfen wurde.

Notwendig wurde die Analytik jedoch für die Bestimmung des Gehaltes an flexiblen Vesikeln und DNS nach der Passage einer CTAB-DNS-Suspension durch 50 nm Polycarbonatporen. Dazu wurde die Absorption einer Vesikelsuspension bei 232 nm und 260 nm sowie einer reinen DNS-Lösung bei 232 nm und 260 nm bestimmt; beide wurden dazu in einer 1:1 Mischung aus Isopropanol und Phosphatpuffer gelöst. Daraus wurden, wie in Kapitel 5.10.1.1 angegeben, die spezifischen Absorptionen der beiden Bestandteile bei den jeweiligen Wellenlängen bestimmt und anhand dieser Werte die Wiederfindungsraten von DNS und flexiblen Vesikeln bei den jeweiligen Drücken.

Anhang 11 enthält die Meßwerte dieser Bestimmung. Daraus errechnen sich folgende spezifische Absorptionen von DNS und Vesikelsuspension bei 232 nm und 260 nm:

$$A^*_{\text{Susp. 232 nm}} = (0,234/150 \mu\text{l} + 0,523/350 \mu\text{l} + 0,763/500 \mu\text{l}) = 1,5268 \cdot 10^{-3} \mu\text{l}^{-1}$$

$$A^*_{\text{Susp. 260 nm}} = (0,037/150 \mu\text{l} + 0,083/350 \mu\text{l} + 0,125/500 \mu\text{l}) = 2,4460 \cdot 10^{-4} \mu\text{l}^{-1}$$

$$A^*_{\text{DNS 232 nm}} = (0,048/150 \mu\text{l} + 0,108/350 \mu\text{l} + 0,160/500 \mu\text{l}) = 3,1619 \cdot 10^{-4} \mu\text{l}^{-1}$$

$$A^*_{\text{DNS 260 nm}} = (0,110/150 \mu\text{l} + 0,257/350 \mu\text{l} + 0,374/500 \mu\text{l}) = 7,3854 \cdot 10^{-4} \mu\text{l}^{-1}$$

Die Absorptionen des jeweils anderen, störenden Bestandteils betragen bei 232 nm etwa ein Fünftel und bei 260 nm etwa ein Drittel der erwünschten Absorption. Die errechneten Mengen für DNS und Vesikelsuspension haben daher einen gewissen Fehler, wie auch die folgende Tabelle für den Fall der DNS-Vesikel vor dem PA zeigt, wo als Wiederfindung statt der zu erwartenden $2 \cdot 100 \%$ nur 89,3 % und 109,9 % angegeben sind. Die weiteren Meßwerte geben die Gehalte an DNS und flexiblen Vesikeln nach der Passage von 50 nm Poren an:

Formulierung	Wiederfindung Vesikel [%] ¹⁾	Wiederfindung DNS [%] ¹⁾
DNS-Vesikel vor Filtration	89,3 ± 1,4	109,9 ± 2,1
DNS-Vesikel 0,2 MPa	81,1 ± 3,1	44,7 ± 2,5
DNS-Vesikel 0,5 MPa	89,1 ± 6,0	58,9 ± 4,7
DNS-Vesikel 1,0 MPa	89,2 ± 1,8	91,3 ± 1,0

Tabelle 7: Wiederfindung von CTAB-Vesikeln und DNS nach Filtration durch 50 nm Poren

¹⁾ Zur Berechnung dieser Werte wurden die Gleichungen I.' und II.' verwendet (s. 5.10.1.1)

Die Vesikel sind somit selbst bei dem niedrigsten Druck von 0,2 MPa zu > 90 % im Filtrat zu finden (bezogen auf den Wert der DNS-Vesikel vor dem Penetration-Assay). Im Fall der DNS ist die Wiederfindung stark druckabhängig und selbst bei 1 MPa sind nur etwa 80 % der DNS (bezogen auf den Wert der DNS-Vesikel vor dem Penetration-Assay) im Filtrat zu finden.

Diese Wiederfindungsraten zeigen, daß die getestete Formulierung von DNS-CTAB – Vesikeln noch nicht optimal ist. Die flexiblen Vesikel selbst penetrieren die Poren zwar recht gut, aber es tritt ein Verlust an DNS auf. Dies läßt darauf schließen, daß ein Teil der DNS bei der Passage der 50 nm Poren abgestreift wird.

6.6.3.2 SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel

6.6.3.2.1 Analytik von SPC und Polysorbat

Die Analytik dieser Bestandteile war nötig, um nachzuweisen, daß keiner von beiden bei der Filtration der Vesikelsuspensionen mit oder ohne DNS an- oder abgereichert wird. Deshalb wurden von den jeweiligen Suspensionen ein Spektrum vor und nach der Passage von 30 nm Poren aufgenommen. Die nächsten drei Abbildungen zeigen dabei folgende Suspensionen:

- SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/24/6, TL 10 %, ohne DNS (Abbildung 38)
- SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/4, TL 1 %, mit DNS (Abbildung 39)
- SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/4, TL 10 %, mit DNS (Abbildung 40)

Das Schaubild für die Vesikel der Zusammensetzung 30/24/3 ist fast deckungsgleich mit dem in Abbildung 38 gezeigten und daher nicht extra aufgeführt. In den Abbildungen dargestellt ist jeweils der Bereich, in dem sich leichte Änderungen der Spektren zeigen, d.h. in den nicht dargestellten Bereichen von Absorption und Wellenlänge sind die Spektren identisch.

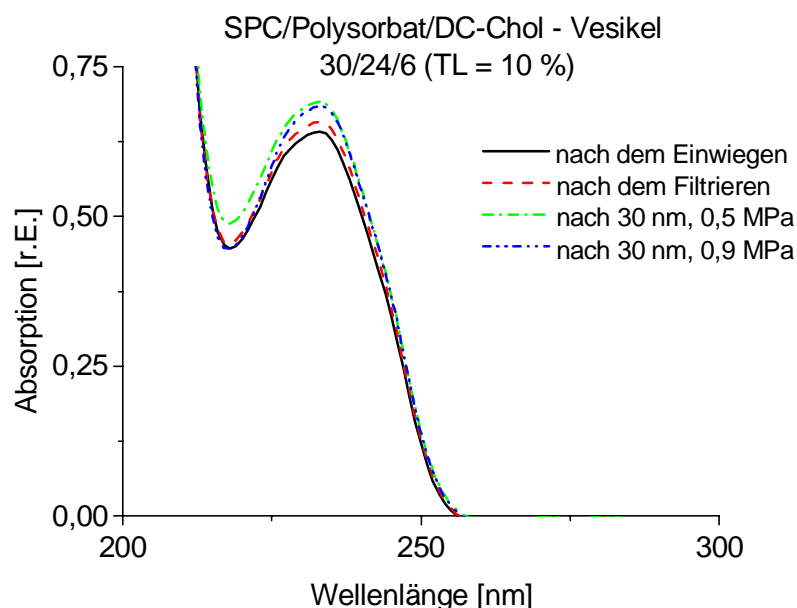


Abbildung 38: Spektren der SPC/Polysorbat/DC-Chol – Vesikel nach verschiedenen Maßnahmen

Setzt man das Spektrum der Probe nach dem Resuspendieren auf 100 % und errechnet aus den spezifischen Absorptionen der Einzelspektren von SPC und Polysorbat die Wiederfindung, so ergibt sich folgendes Bild:

Wiederfindung	nach dem Einwiegen	nach der Herstellungsfiltration	nach der Filtration durch 30 nm bei ...	
			0,5 MPa	0,9 MPa
SPC [%]	100,0	100,8	97,3	112,9
Polysorbat [%]	100,0	106,3	101,9	114,6

Tabelle 8: Wiederfindung von SPC und Polysorbat in der Formulierung 30/24/6

Im Rahmen der Meßgenauigkeit des Verfahrens ist damit gezeigt, daß die untersuchten Suspensionen während der Herstellung und der Passage durch 30 nm Poren kein SPC und kein Polysorbat verlieren.

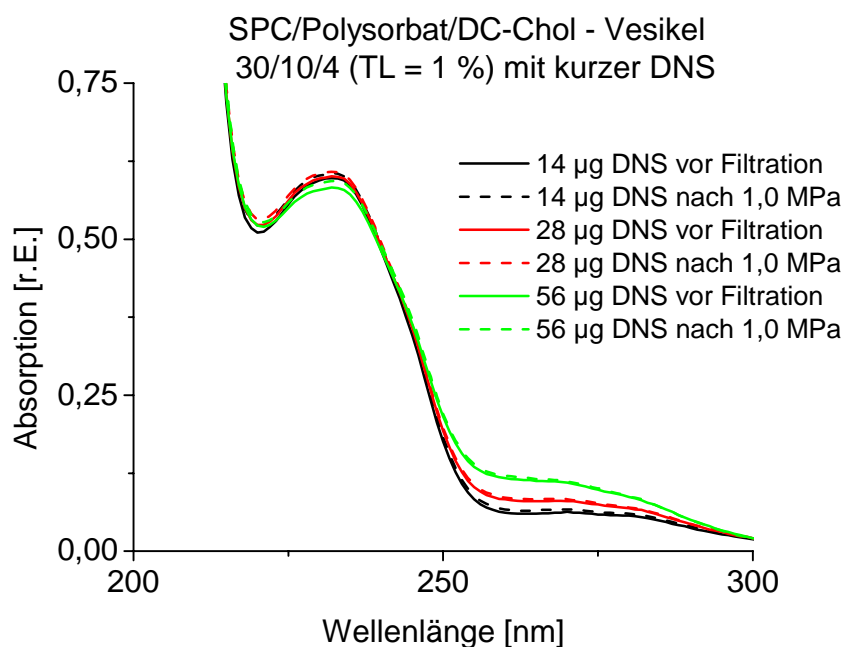


Abbildung 39: Spektren von mit DNS beladenen DC-Chol – Vesikeln (TL 1 %)

Wie man an Abbildung 39 sieht, ist sowohl die Wiederfindung von SPC und Polysorbat, als auch von DNS bei den Vesikeln der Zusammensetzung 30/10/4 so gut wie quantitativ.

Aufgrund der geringen Absorption der DNS im Vergleich zu den Vesikeln ist jedoch noch eine genauere Quantifizierung der DNS nötig (s. Kapitel 6.6.3.2.3). Setzt man das Spektrum der Probe mit 14 µg DNS vor der Filtration auf 100 % und errechnet aus den spezifischen Absorptionen der Einzelspektren von SPC und Polysorbat die Wiederfindung, so ergeben sich folgende Werte:

Wiederfindung	14 µg DNS		28 µg DNS		56 µg DNS	
	vor Filtr.	nach 1 MPa	vor Filtr.	nach 1 MPa	vor Filtr.	nach 1 MPa
SPC [%]	100,0	102,3	103,6	105,0	106,8	108,4
Polysorbat [%]	100,0	101,3	100,7	102,1	97,8	99,7

Tabelle 9: SPC und Polysorbat – Gehalt in DNS haltigen Formulierung mit 1 % TL Vesikeln

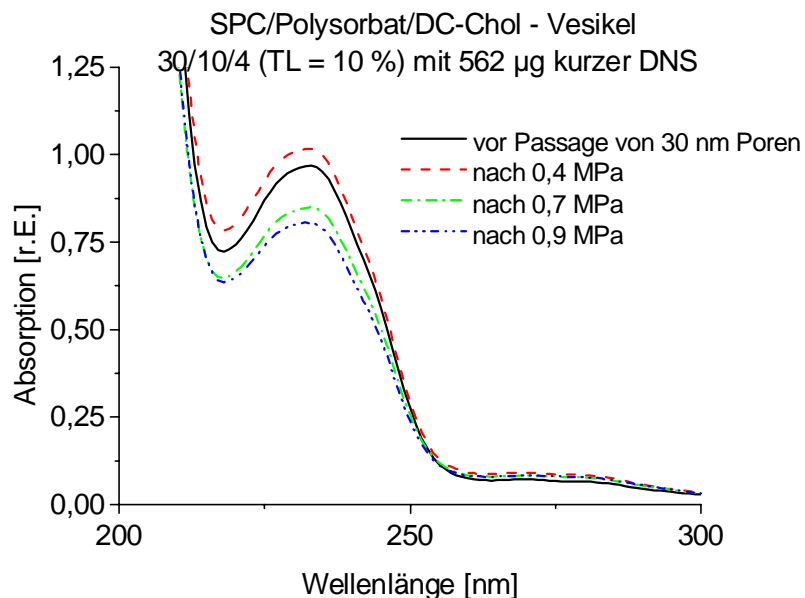


Abbildung 40: Spektren von mit DNS beladenen DC-Chol – Vesikeln (TL 10 %)

Die hier gezeigten Spektren weisen zwar die größten Abweichungen, aber keine eindeutige Tendenz auf. Setzt man hier die Kurve mit Vesikeln vor der Filterpassage als Referenzwert an, ergeben sich für SPC und Polysorbat folgende Wiederfindungen:

Wiederfindung	Vesikel 3/1/0,4 TL 10 % mit 562 µg DNS			
	vor 30 nm Poren	nach 0,4 MPa	nach 0,7 MPa	nach 0,9 MPa
SPC [%]	100,0	113,9	94,4	102,2
Polysorbat [%]	100,0	104,7	88,0	82,3

Tabelle 10: SPC und Polysorbat – Gehalt in DNS haltigen Formulierung mit 10 % TL Vesikeln

Als Schlußfolgerung aus den gesamten Untersuchungen zur Wiederfindung von SPC und Polysorbat in SPC-Polysorbat-DC-Chol –Vesikeln ist zu ziehen, daß die Meßergebnisse zwar mit einem gewissen Fehler behaftet sind, die Zusammensetzung der Formulierung jedoch im Rahmen dieses Fehlers unverändert bleibt. Die Bindung von DNS an Vesikel der Zusammensetzung 30/10/4 beeinträchtigt die Passage von SPC und Polysorbat also nicht.

6.6.3.2.2 Analytik von DC-Chol

Die Bestimmung von DC-Chol erfolgte mittels einer modifizierten Liebermann-Burchard-Reaktion (s. 5.10.1.2.2). Die geringe Menge vorhandener DNS beeinflusste diese Reaktion nicht, dem Einfluß von SPC und Polysorbat wurde durch Berücksichtigung entsprechender Mengen dieser Stoffe bei der Erstellung der Kalibriergerade Rechnung getragen. Anhang 12 zeigt die verwendeten Volumina und die Meßwerte für die Kalibriergerade der Formulierung SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/x/y,

Anhang 13 dasselbe für die Formulierungen 30/24/z. Dies führt zu folgenden Kalibriergeraden:

I. Formulierung 30/x/y: $y = 5,602 \cdot 10^{-3} \cdot x [\mu\text{g DC-Chol}] + 1,115 \cdot 10^{-4}$ ($r = 0,9998$)

II. Formulierung 30/24/z : $y = 6,180 \cdot 10^{-3} \cdot x [\mu\text{g DC-Chol}] + 6,127 \cdot 10^{-3}$ ($r = 0,9999$)

Mit diesen Kalibriergeraden wurde zuerst bestimmt, wieviel DC-Chol sich in die Membran von SPC/Polysorbat/DC-Chol Vesikel einarbeiten läßt. Dazu wurde der DC-Chol – Gehalt der angesetzten Formulierungen 30/10/5 und 30/10/10 sowie 30/20/20 vor und nach der letzten Herstellungsfiltration bestimmt. Mit der Kalibriergerade I. ergeben sich folgende Wiederfindungen (Meßwerte s. Anhang 14):

Formulierung	Wiederfindung DC-Chol [%]	tatächliche Zusammensetzung
30/10/5 (TL 10 %)	111,7	30/10/5,6
30/10/10 (TL 10 %)	83,8	30/10/8,4
30/20/20 (TL 10 %)	48,8	30/20/9,8

Tabelle 11: Wiederfindung von DC-Chol in den vier ursprünglich verwendeten Ansätzen

Während der Filtration von Formulierungen mit einem TL – Gehalt von 10 % geht also ein Teil des DC-Chols aus den Vesikeln verloren. (Der Wert für die Wiederfindung von DC-Chol in der Formulierung 30/10/5 liegt höher als 100 %, was – neben einem gewissen Meßfehler – daran liegen dürfte, daß der Filterkuchen dieser Charge auch einen Teil des Phosphatpuffers mit einschließt, so daß die filtrierte Suspension etwas aufkonzentriert wird.) Der für die Filtration im Rahmen der Herstellung verwendete 100 nm Polycarbonatfilter wies jedoch bereits bei der niedrigsten eingesetzten DC-Chol – Menge einen kleinen Anteil feiner Kristallnadeln auf. Daher wurde beschlossen, für alle weiteren Experimente die Zusammensetzung SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/4 zu verwenden. Dies sorgt dafür, daß die Vesikel auch Filter mit einer Porengröße von < 100 nm passieren können (z.B. im Rahmen eines Penetration Assays), ohne daß es dabei zu einem DC-Chol – Verlust kommt. Ausgehend von dieser Formulierung wurde der Polysorbat-Anteil variiert, um die Flexibilität der Vesikel für *in vivo* Versuchen zu erhöhen.

Auch bei diesen Formulierungen betrug die Wiederfindung nach der Passage von 30 nm Filtern nahezu 100 % (Meßwerte s. Anhang 15):

Formulierung	UV – Absorption		Wiederfindung [%]
	Theoriewert laut Kalibriergerade	Mittelwert der Messungen	
30/24/3 vor der Filtration	0,1685	0,167	99,1 ± 3,7
30/24/3 nach 0,5 MPa		0,164	97,3 ± 3,7
30/24/3 nach 0,7 MPa		0,165	97,9 ± 1,3
30/24/3 nach 0,9 MPa		0,168	99,7 ± 0,3
30/24/6 vor der Filtration	0,3225	0,325	100,8 ± 1,7
30/24/6 nach 0,5 MPa		0,320	99,2 ± 0,6
30/24/6 nach 0,7 MPa		0,322	99,8 ± 2,7
30/24/6 nach 0,9 MPa		0,323	100,1 ± 2,5

Tabelle 12: Wiederfindung von DC-Chol in SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/24/z Formulierungen

Für die Adsorption von DNS an DC-Chol-Vesikel wurde die Formulierung 30/10/4 gewählt. Zuerst wurden dabei Vesikel mit einem Gesamtlipidgehalt von 1 % verwendet und der Gehalt der Bestandteile an SPC, Polysorbat, DC-Chol und DNS vor und nach der Passage von 1,0 MPa durch 30 nm Poren gemessen. Nach den ermutigenden Ergebnissen dieser Messungen wurde der TL-Gehalt auf 10 % erhöht, den Vesikeln die u.g. Mengen DNS zugegeben. Jeweils 300 µl der daraus entstandenen Suspensionen wurden in die Filterkerze des Penetration Assays gefüllt und bei verschiedenen Drücken (0,4 MPa, 0,7 MPa, 0,9 MPa) durch 30 nm Poren gepreßt. Die Meßwerte der DC-Chol-Bestimmung sind in Anhang 16 aufgeführt, die folgende Tabelle faßt die Daten zusammen und zeigt, daß die Vesikelzusammensetzung sich während der Passage der Poren nicht ändert.

SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/4	UV – Absorption		Wiederfindung [%]
	Theoriewert laut Kalibriergerade	Mittelwert der Messungen	
TL 1 %, 14 µg DNS, vor Filtration	0,05736	0,057	99,4 ± 6,2
TL 1 %, 28 µg DNS, vor Filtration		0,055	95,9 ± 4,5
TL 1 %, 56 µg DNS, vor Filtration		0,056	97,6 ± 3,6
TL 1 %, 14 µg DNS, nach 1,0 MPa		0,057	99,4 ± 3,5
TL 1 %, 28 µg DNS, nach 1,0 MPa		0,056	97,6 ± 3,7
TL 1 %, 56 µg DNS, nach 1,0 MPa		0,053	92,4 ± 1,9
TL 10 %, 562 µg DNS, vor Filtration	0,1432	0,145	101,3 ± 3,4
TL 10 %, 562 µg DNS, nach 0,4 MPa		0,145	101,3 ± 2,1
TL 10 %, 562 µg DNS, nach 0,7 MPa		0,127	88,7 ± 2,8
TL 10 %, 562 µg DNS, nach 0,9 MPa		0,133	92,8 ± 3,0

Tabelle 13: Wiederfindung von DC-Chol in verschiedenen DNS haltigen DC-Chol – Vesikeln

6.6.3.2.3 Analytik von DNS

Die Analytik von DNS mit Hilfe der Einlagerung von Ethidiumbromid in die DNS-Doppelhelix sollte die Frage beantworten, ob DNS bei der Passage der DNS-Lipidvesikel durch 30 nm Poren verlorengeht.

Durchgeführt wurde die Analytik der DNS beladenen Vesikel mit der Vesikel-Formulierung SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/4 sowie kurzer DNS; die genaue Zusammensetzung und die Meßwerte der untersuchten DNS-Vesikel gibt Anhang 18 wieder.

Die Bestimmung der DNS mit Hilfe von Ethidiumbromid wurde wider Erwarten nicht von der Anwesenheit der Lipidvesikel beeinflusst; dies zeigen die folgenden Kalibriergeraden, denen die Meßwerte aus Anhang 17 zugrunde liegen:

- I. Kalibriergerade ohne Vesikel: $y = 1,051 \cdot 10^{-2} \cdot x + 1,7436$
 II. Kalibriergerade mit Vesikeln: $y = 1,079 \cdot 10^{-2} \cdot x + 1,7765$

Anhand der Kalibriergerade II. errechnen sich folgende Wiederfindungen für DNS:

Formulierung	Wiederfindung DNS [%]
TL 1 %, 14,06 µg DNS, vor Filtration	100,0 ± 2,2
TL 1 %, 28,12 µg DNS, vor Filtration	99,4 ± 1,9
TL 1 %, 56,24 µg DNS, vor Filtration	100,8 ± 2,4
TL 1 %, 14,06 µg DNS, nach 1,0 MPa	106,6 ± 3,4
TL 1 %, 28,12 µg DNS, nach 1,0 MPa	99,4 ± 3,5
TL 1 %, 56,24 µg DNS, nach 1,0 MPa	87,6 ± 3,1
TL 10 %, 562,4 µg DNS, vor Filtration	96,2 ± 2,3
TL 10 %, 562,4 µg DNS, nach 0,4 MPa	102,7 ± 0,0
TL 10 %, 562,4 µg DNS, nach 0,7 MPa	99,4 ± 3,5
TL 10 %, 562,4 µg DNS, nach 0,9 MPa	106,0 ± 3,5

Tabelle 14: DNS – Wiederfindungen bei verschiedenen DNS-DC-Chol-Vesikeln

Die Tabelle zeigt, daß die Wiederfindung der DNS nach dem Transport durch die Barriere nahezu quantitativ ist, wobei der Wert, bei dem die Wiederfindung unter 90 % liegt, als Ausreißer zu werten ist, da alle Werte beim höheren Gesamtlipidgehalt im Rahmen einer quantitativen Wiederfindung liegen.

Der Einsatz solcher DNS-Träger für *in vitro* und *in vivo* Versuche ist daher gerechtfertigt.

6.7 *In vitro* Experimente mit Zellkulturen (HEK-Zellen)

Die *in vitro* Experimente mit HEK-Zellkulturen wurden durchgeführt, um die grundsätzliche Transfektionsfähigkeit der DNS-DC-Chol – Vesikel zu testen. Grundvoraussetzung für das Wirkprinzip der flexiblen Vesikel ist die Existenz eines Feuchtigkeitsgradienten, der den aktiven Transport der Vesikel ermöglicht. Da bei den *in vitro* Versuchen die zu transfizierenden Zellen komplett mit Nährlösung bedeckt sein müssen, um zu überleben, ist das Aufrechterhalten eines Feuchtigkeitsgradienten nicht möglich. Eine Optimierung der gewählten Systeme anhand der Ergebnisse der Zellkulturversuche wurde wegen der sehr verschiedenen Versuchsbedingungen von *in vitro* und *in vivo* Versuchen nicht durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluß folgender Parameter auf die Transfektionseffizienz untersucht:

- verschiedene SPC/Polysorbat/DC-Chol – Formulierungen (30/10/5; 30/10/8,4; 30/20/9,8)
- verschiedene Gesamtlipidgehalte (TL = 10 %, 5 %, 1 %, 0,2 %)
- verschiedene Ladungsverhältnisse kation. Lipid : DNS (11,8 : 1 bzw. 5,90 : 1)
- verschiedene DNS-Mengen (1,6 µg, 0,4 µg und 0,1 µg)

Anhang 19 gibt die genauen Zusammensetzung der untersuchten Formulierungen wieder; die Angaben sind jeweils die Gesamtvolumina an Vesikeln und DNS für vier Löcher. Als Negativkontrolle wurde den Zellen nur Vesikelsuspension bzw. nur DNS zugegeben. Die Positivkontrolle war EGFP-Plasmid – DNS, die mit Fugene[®] kombiniert wurde.

Die Experimente führten zu folgenden Ergebnissen:

- Die Positivkontrolle mit Fugene[®] führte auf allen getesteten acht Platten (s. Anhang 19) zu etwa 30 – 50 % grün fluoreszierenden Zellen. Das zeigt, daß die verwendete DNS transfektionsfähig ist.
- Die Negativkontrolle (die Zugabe reiner Vesikel oder reiner DNS) fiel negativ aus: keines der mikroskopierten Glasplättchen wies eine einzige grün fluoreszierende Zelle auf. Dies zeigt, daß weder DNS, noch kationische Vesikel für sich alleine transfektionsfähig sind.
- Zwischen den beiden Negativkontrollen war morphologisch kein Unterschied festzustellen, d.h. die verwendeten Mengen der kationischen Vesikel waren nicht zelltoxisch.
- Alle o.g. Formulierungen, die Lipidgemisch-DNS-Vesikel enthielten, sind beim Einsatz einer ausreichenden Menge an DNS dazu in der Lage, Zellen zu transfizieren. Die Effizienz dieser Formulierungen ist im Vergleich zu der von Fugene[®] jedoch sehr schlecht,

- da meist nur einzelne transfizierte Zellen zu beobachten waren, während mit Fugene[®] – wie oben erwähnt – ca. 30 – 50 % der ausgesäten 50.000 Zellen transfiziert wurden.
- Da bei allen getesteten Formulierungen maximal 20 transfizierte Zellen zu beobachten waren, sind absolute Aussagen kaum möglich. Vergleicht man jedoch alle drei getesteten Formulierungen, so ist zu beobachten, daß mit steigendem DC-Chol – Anteil auch der Anteil an transfizierten Zellen anstieg, d.h. die 30/20/9,8 – Formulierung wies insgesamt die höchsten Transfektionsraten auf. Ebenfalls eine gewisse Korrelation bestand zwischen der Menge der verwendeten DNS und der Anzahl der transfizierten Zellen, d.h. je mehr DNS mit den Vesikeln assoziiert war, desto höher war die Anzahl der fluoreszierenden Zellen. So waren bei der Verwendung von 0,1 µg DNS und der 30/20/9,8 – Formulierung einige Zellen transfiziert, während bei den beiden anderen Formulierungen nur beim Einsatz von höheren DNS-Mengen fluoreszierende Zellen zu beobachten waren.
 - Betrachtet man die beiden eingesetzten Lipid/DNS – Verhältnisse, so ist bei allen drei getesteten Formulierungen und den jeweils verwendeten drei DNS – Mengen festzustellen, daß bei höheren Lipid/DNS – Verhältnissen, also bei geringerer DNS – Belastung pro Lipidvesikel, eine bessere Transfektion erreicht wurde.
 - Der Gesamtlipidgehalt zum Zeitpunkt des Mischens mit der DNS hatte keinen einheitlichen Effekt auf die Transfektion. Während die Formulierung SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/8,4 mit sinkendem Gesamtlipidgehalt die Anzahl der transfizierten Zellen ansteigen ließ, war diese Tendenz bei der Formulierung 30/20/9,8 nicht zu erkennen.

Diese Beobachtungen stimmen mit der Schlußfolgerung der Größenmessung überein, daß die Größe und damit die Transfektionsfähigkeit der einmal gebildeten DNS-Lipidvesikel kaum vom TL – Gehalt abhängt, sondern v.a. von der zugegebenen DNS-Menge. Dies ist für die *in vivo* Experimente wichtig, da die DNS-Lipidvesikel nach dem Eintrocknen auf der Haut aufkonzentriert werden. Wäre die Größe/Transfektionsfähigkeit der DNS-Lipidvesikel vom TL – Gehalt abhängig, wären Vorhersagen über das *in vivo* Verhalten dieser Vesikel schwierig.

Die Formulierungen 30/24/3 und 30/24/6, die im Vergleich zu den oben genannten – bei gleichem absoluten Anteil DC-Chol in den beiden Formulierungen 30/24/6 und 30/10/4 – mehr Polysorbat und weniger SPC enthielten, wurden ebenfalls *in vitro* eingesetzt. Dabei wurde – ausgehend von vorherigen Ergebnissen – bei einer fixen DNS-Menge von 1 µg das Ladungsverhältnis von Lipid zu DNS erhöht. Bei der Auswertung stellte sich jedoch heraus, daß diese Komplexe zu toxisch für die Zellen waren: alle untersuchten Zellkulturen waren stark deformiert, was ein Zeichen für das Absterben der Zellen ist. Diese Deformation war umso größer, je größer die verwendete Lipidmenge war. Der DC-Chol-Anteil der Formulierungen 30/24/6 ist gleich bzw. im Fall der 30/24/3 – Formulierung sogar niedriger als bei den zuvor eingesetzten

Formulierungen; dieses Molekül ist also als Ursache für den Zelltod auszuschließen. SPC ist als Membranbaustein von Zellen ebenfalls nicht toxisch, so daß diese Beobachtung dem höheren Polysorbat-Anteil zuzuschreiben sein dürfte, zumal bekannt ist, daß Polysorbat zelltoxisch wirkt [113]. Die Positivkontrolle ergab – wie zu erwarten – transfizierte Zellen, die Negativkontrolle mit reiner DNS wies keine morphologischen Besonderheiten auf. So war gewährleistet, daß die Beobachtungen nicht auf die Versuchsbedingungen zurückzuführen sind. Daher bleibt nur der höhere Polysorbat-Anteil der 30/24/3 – bzw. 30/24/6 – Formulierung im Vergleich zur den o.g. Formulierungen.

Schlußfolgerung der *in vitro* Versuche mit HEK 293 Zellen ist, daß die Formulierungen 30/10/5 sowie 30/10/8,4 und 30/20/9,8 grundsätzlich transfectionsfähig sind, wobei sich ein höherer DC-Chol-Anteil als vorteilhaft erweist. Dennoch wurde für die *in vivo* Experimente die Formulierung 30/10/4 entwickelt. Der wichtigste Grund dafür ist, daß die Membranflexibilität dieser 30/10/4 – Formulierung, die für die *in vivo* Experimente von entscheidender Bedeutung ist, im Vergleich zu den anderen beiden Formulierungen am höchsten ist.

6.8 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die mit flexiblen Vesikeln und DNS behandelte Haut wurde mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie untersucht, um Vesikel, DNS und – falls vorhanden – das exprimierte Protein nebeneinander nachweisen zu können. Vesikel und DNS wurden mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, das eventuell synthetisierte Protein fluoresziert ebenfalls.

Für die ersten Experimente wurde die Formulierung 30/10/4 verwendet sowie DNS, die für grün fluoreszierendes Protein (GFP) codiert. Bei der Auswertung dieser ersten Versuchsreihe stellte sich jedoch heraus, daß auch unbehandelte Hautproben eine grüne Eigenfluoreszenz aufweisen. Diese Eigenfluoreszenz ist im oberen Bereich der Epidermis besonders deutlich. Durch dieses Phänomen ist eine Unterscheidung zwischen unerwünschter Eigenfluoreszenz des Gewebes und erwünschter Fluoreszenz durch eventuell exprimiertes Protein nicht möglich.

Deshalb wurden in einer weiteren Versuchsreihe dieselben Vesikel (30/10/4) – mit Plasmid-DNS kombiniert, die für cyan fluoreszierendes Protein (CFP) codiert. Bei den dabei erhaltenen Bildern war keine cyanfarbene Fluoreszenz zu beobachten. Da die theoretische und tatsächlich zur Verfügung stehende Anregungswellenlänge jedoch recht weit auseinander lagen ($\lambda_{\text{theor.}} = 434 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{tats.}} = 458 \text{ nm}$) (s. Tabelle 3), könnte es sein, daß die zur Verfügung stehende Wellenlänge nicht geeignet war, um das nur in geringen Mengen exprimierte CFP zu detektieren.

In einer dritten Versuchsreihe wurden die Vesikel SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/4 mit Plasmid-DNS kombiniert, die für ein rot fluoreszierendes Protein codiert. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen des Fluoreszenzfarbstoffs für die Vesikel sowie des rot fluoreszierenden Proteins sind zwar fast identisch (s. 5.13), die Unterscheidung der beiden Substanzen ist aber aus zwei Gründen trotzdem möglich:

1. Kombiniert man nicht fluoreszierende Vesikel mit fluoreszenzmarkierter DNS, so kann eine auftretende Rotfärbung in diesem Fall nur von exprimiertem Protein stammen.
2. Selbst bei der Verwendung fluoreszenzmarkierter Vesikel sollte eine Differenzierung zwischen exprimiertem Protein und Vesikelfarbstoff möglich sein, da eine Rotfärbung in den Zellen eine Expression von Protein andeutet, während eine Rotfärbung zwischen den Zellen die parazelluläre Wanderung der Vesikel zeigt.

Bei diesen Experimenten war jedoch keine Rotfärbung in den Zellen, also keine Expression der DNS, feststellbar.

In späteren Experimenten wurde der SPC-Anteil der Vesikel reduziert und der Polysorbat-Anteil erhöht, was zu den Formulierungen 30/24/3 und 30/24/6 führte. Diese erwiesen sich bei den *in vitro* Versuchen als zu toxisch für die Zellen; daß sie dennoch für die *in vivo* Versuche verwendet wurden, hatte folgenden Grund: Die *in vitro* Toxizität dieser beiden Formulierungen stammt

von dem Anteil an Polysorbat, der sich aufgrund seiner CMC nicht in der Vesikelmembran, sondern in der Lösung befindet. Dieser Anteil ist aufgrund der sehr verdünnten Lösung bei den *in vitro* Versuchen verhältnismäßig hoch; beim Eintrocknen von Vesikelsuspensionen auf der Haut hingegen reichert sich das Polysorbat in den Vesikeln an, womit seine Toxizität stark herabgesetzt wird. Mit den 30/24/3 und 30/24/6 – Formulierungen wurde getestet, ob diese Trägersysteme aufgrund höherer Flexibilität tiefer in die Haut eindringen. Die Vesikel wurden wieder mit Plasmid-DNS kombiniert, die für rot fluoreszierendes Protein codiert. Beim Vergleich der drei verwendeten Trägersysteme 30/10/4, 30/24/3 und 30/24/6 ergab sich jedoch kein deutlicher Unterschied in deren *in vivo* Eigenschaften, d.h. die Eindringtiefe in die Haut war bei allen vergleichbar.

Obwohl mittels CLSM keine Expression von fluoreszierenden Proteinen nach dem epicutanen Auftrag von DNS tragenden flexiblen Lipidvesikeln zu detektieren war, ließen sich einige Erkenntnisse aus diesen Versuchen ableiten:

- Bei der Betrachtung der unmarkierten Haut bei 488 nm war dank der intensiven grünen Eigenfluoreszenz der Haut folgender Aufbau der murinen Haut zu erkennen: Die Dicke des Stratum corneum beläuft sich auf 2 – 3 μm , das Ende des sich dann anschließenden Stratum granulosum liegt bei ca. 7,5 μm , bevor bei etwa 24,5 μm die Epidermis mit dem Stratum basale mit kleinen, runden Zellen endet.
- Wird nur DNS auf die Haut aufgetragen, so ist diese nicht in der Lage, weiter als maximal 2 μm tief zu gelangen, was als Beweis für die guten Barriereigenschaften der Haut gewertet werden kann.
- Auch DC-Chol – freie flexible Polysorbat-Vesikel (30/24/0) sind nicht in der Lage, DNS in tiefere Hautschichten zu transportieren.
- Es besteht kein signifikanter Unterschied in der Penetrationstiefe zwischen den unbeladenen und den mit DNS beladenen Vesikeln. Bei allen getesteten Formulierungen lassen sich DNS und Vesikel bis in eine Tiefe von ca. 7 – 8 μm nachweisen.
- Vesikel und DNS sind über weite Strecken in die Haut an denselben Stellen lokalisiert. Das deutet darauf hin, daß die DNS an die Lipidvesikel gebunden ist und dies auch unter *in vivo* Bedingungen so bleibt. Bei manchen Aufnahmen war festzustellen, daß die DNS etwas weiter in die Haut eindringt als die Vesikel, was darauf hindeuten könnte, daß in den tieferen Hautschichten eine Dissoziation von Vesikeln und DNS auftritt. Dies könnte daran liegen, daß in tieferen Hautschichten ein pH-Wert vorliegt, der dem physiologischen pH-Wert von 7,4 nahekommt und damit genau dem pK_S – Wert von DC-Chol entspricht, was der DNS eine Dissoziation von den Vesikeln erleichtert.

- Die intradermal injizierten DNS-Lipidvesikel lassen nur eine diffuse Lokalisation von DNS und Vesikeln zu, auch hier ist jedoch eine Expression von fluoreszierendem Protein nicht zu beobachten. Es ist daher nicht verwunderlich, daß auch die epicutan aufgetragenen DNS-Lipidvesikel zu keiner Expression führen. Um diesbezüglich Abhilfe zu schaffen, ist es notwendig, das System molekularbiologisch zu verbessern.

Die Ergebnisse der *in vivo* Versuche deuten darauf hin, daß die Eindringtiefe von DNS mit Lipidvesikeln größer ist als die von reiner DNS ohne Träger; Träger und DNS sind bis in eine Tiefe von etwa 7 – 8 µm zu lokalisieren. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen anderer Versuche, bei denen die fluoreszierenden Lipidvesikel auf die Haut aufgetragen und anschließend die Lokalisation dieser Vesikel bestimmt wurde, so ergibt sich, daß all diese Versuche sich in wesentlichen Punkten von den hier durchgeführten unterscheiden:

- Bei der Verwendung der von Toulton [114] für CLSM – Versuche eingesetzten sogenannten Ethosomen, also ethanolhaltigen Phospholipidvesikeln, ist zu berücksichtigen, daß der eingesetzte Ethanol als Penetration enhancer wirkt. Dadurch läßt sich auch die beobachtete Penetrationstiefe der Ethosomen von etwa 180 µm erklären.
- Bei der Verwendung von Liposomen hängt es von deren Zusammensetzung ab, ob bzw. wie tief diese in die Haut penetrieren, da die Verwendung von z.B. DOPE die Wahrscheinlichkeit, daß die Liposomen mit den Hautlipiden fusionieren, deutlich erhöht [115].
- Bei der Fusion von herkömmlichen Liposomen mit den Hautlipiden werden einzelne fluoreszierende Phospholipidmoleküle freigesetzt, die mit der Barriere wechselwirken [116]. Die in dieser Arbeit verwendeten flexiblen Vesikel bleiben während der Penetration durch die Haut in ihrer Form jedoch erhalten. Dies zeigen auch die Untersuchungen von Schätzlein [89] und van Kuijk-Meuwissen [117]. Daher sind die mit flexiblen Vesikeln erhaltenen Ergebnisse nicht mit denen vergleichbar, die mit herkömmlichen Vesikeln erzielt wurden.

Im folgenden sind repräsentative Bilder dieser CLSM – Versuche gezeigt; der dargestellte Bildausschnitt ist jeweils 146,2 µm x 146,2 µm groß. Die verwendete Formulierung, die Art der Plasmid-DNS und die zur Detektion eingesetzten Wellenlängen sowie die Scantiefe sind bei jeder Abbildung angegeben.

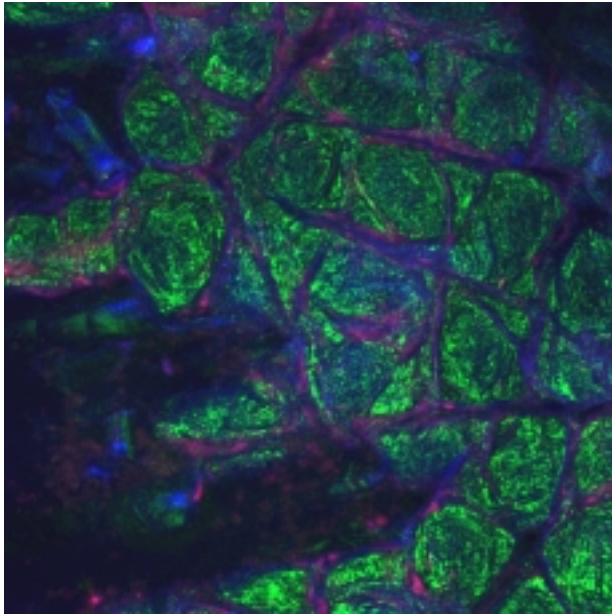


Bild an der Hautoberfläche

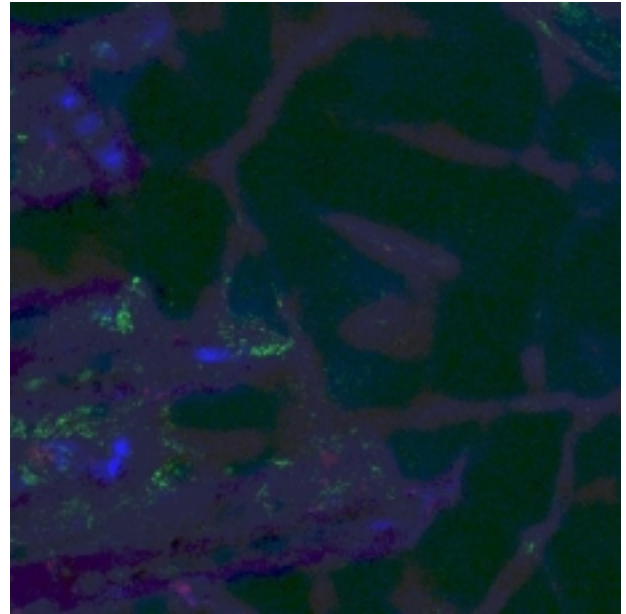


Bild in 6,3 μm Tiefe

Abbildung 41: SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/4 + GFP-Plasmid (488 nm/ 543 nm/ 633 nm)

Bei dieser Abbildung zeigt sich deutlich die grün dargestellte und durch 488 nm detektierbare Eigenfluoreszenz, die v.a. auf der Hautoberfläche zu beobachten ist und in der Tiefe immer schwächer wird. Die rote Fluoreszenz zeigt die Stellen, an denen Vesikel zu lokalisieren sind, während die blauen Stellen DNS zeigen. DNS und Vesikel sind auch in 6,3 μm Tiefe noch teilweise zu erkennen.

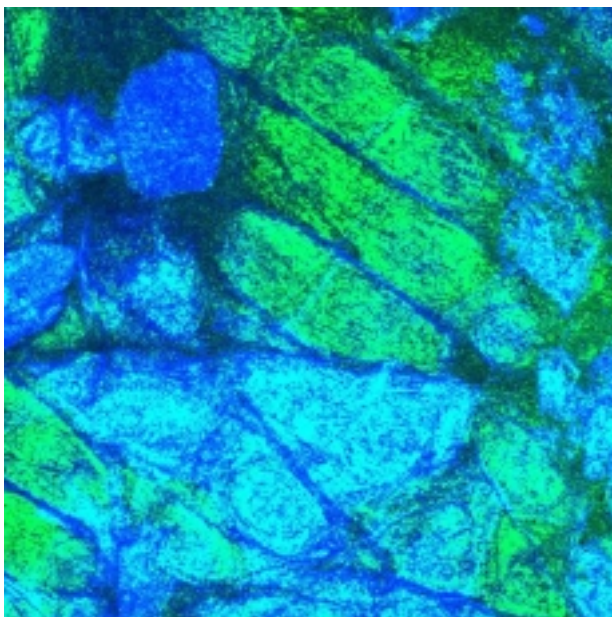


Bild an der Hautoberfläche

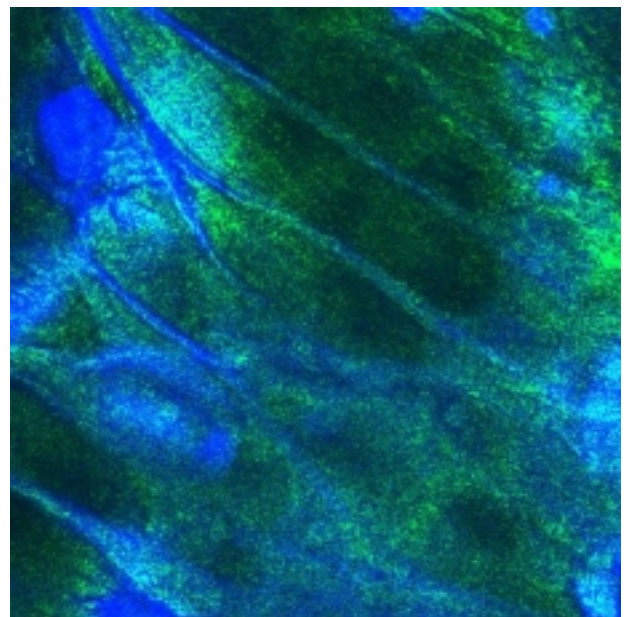


Bild in 6,3 μm Tiefe

Abbildung 42: SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/4 (unmarkiert) + GFP-Plasmid (488 nm/ 633 nm)

Bei Abbildung 43 wurde wieder GFP-Plasmid verwendet, die verwendeten Vesikel waren jedoch nicht fluoreszenzmarkiert. Aufgrund der fehlenden Detektion bei 543 nm sind die Vesikel nicht zu lokalisieren, weiterhin deutlich sichtbar sind jedoch die blaue Fluoreszenz, die die Lokalisation von DNS ermöglicht, sowie die grüne Eigenfluoreszenz der Haut.

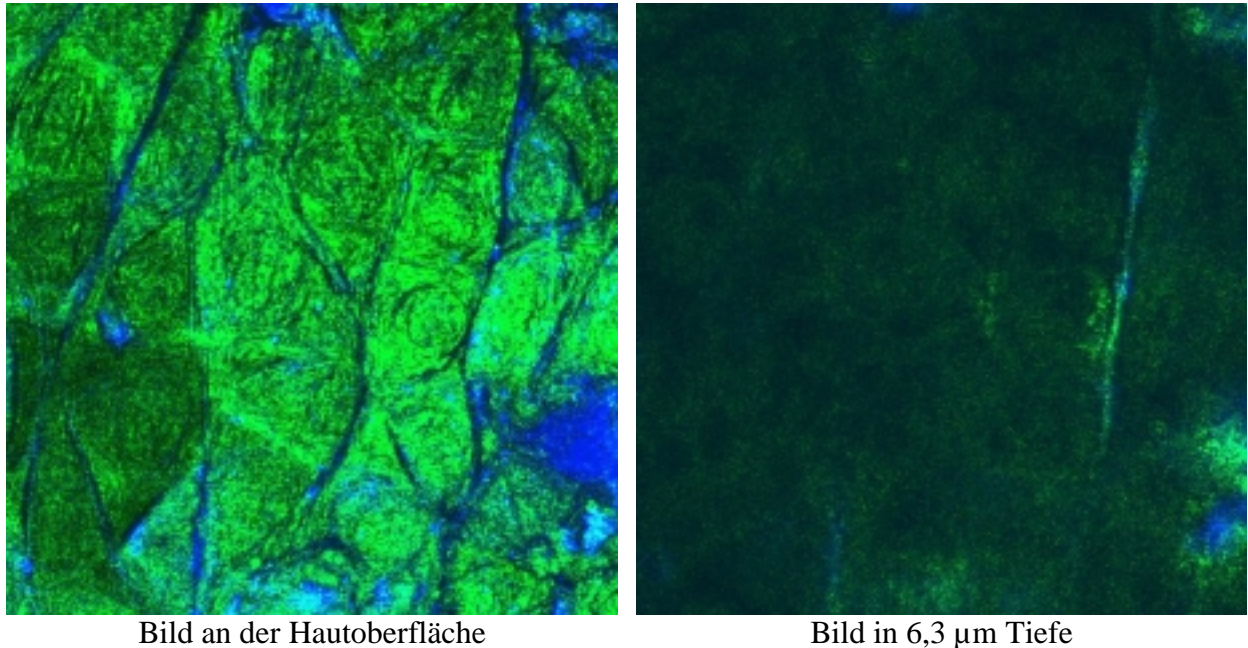


Abbildung 43: reine GFP-Plasmid DNS ohne Vesikel (488 nm/ 633 nm)

Abbildung 43 zeigt wegen des Fehlens fluoreszenzmarkierter Vesikel ebenfalls keine rote Fluoreszenz. Die grün dargestellte Eigenfluoreszenz der Haut sowie die blaue Fluoreszenz der DNS ist auch hier deutlich zu sehen, jedoch ist die im Vergleich zu Abbildung 42 deutlich schwächer ausgeprägte Anwesenheit von DNS in 6,3 µm Tiefe zu erkennen, was darauf hindeutet, daß die DNS nur zusammen mit den Vesikeln in tiefere Hautschichten gelangt.

Da bei der in Abbildung 44 und Abbildung 45 abgebildeten Serie (30/24/z) die Wellenlänge von 488 nm nicht mehr verwendet wurde, ist die grün dargestellte Eigenfluoreszenz der Haut hier nicht mehr zu beobachten. Die Vesikel sind an der Hautoberfläche noch sehr deutlich zu detektieren, aber auch in der Tiefe ist an wenigen Stellen noch eine rote Fluoreszenz zu sehen, was auf die Anwesenheit von fluoreszierenden Vesikeln an diesen Stellen hindeutet.

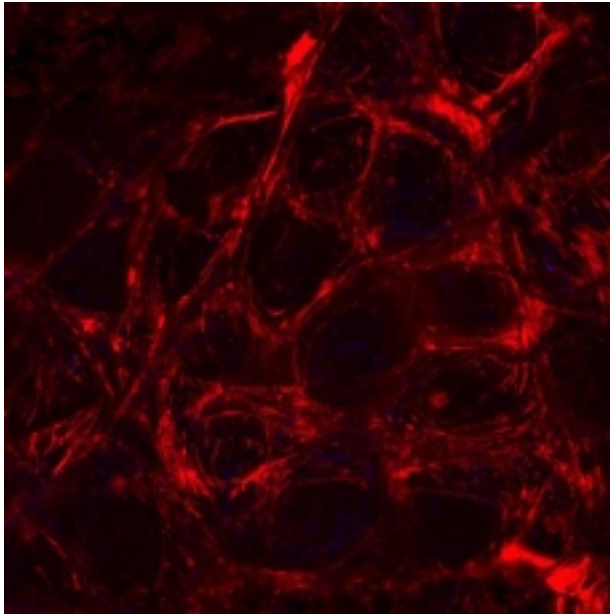


Bild an der Hautoberfläche

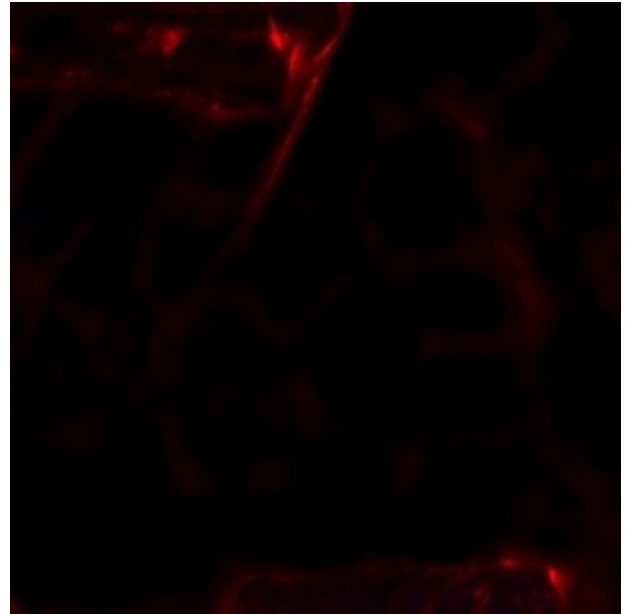


Bild in 6,0 μm Tiefe

Abbildung 44: SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/24/6 ohne DNS (543 nm/ 633 nm)

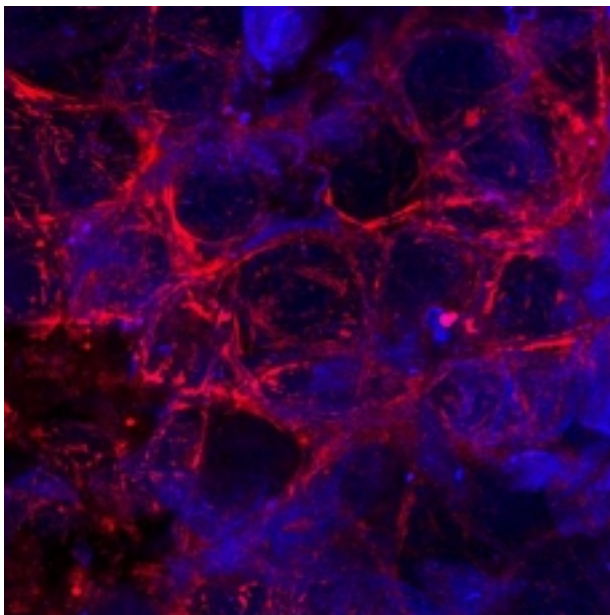


Bild an der Hautoberfläche

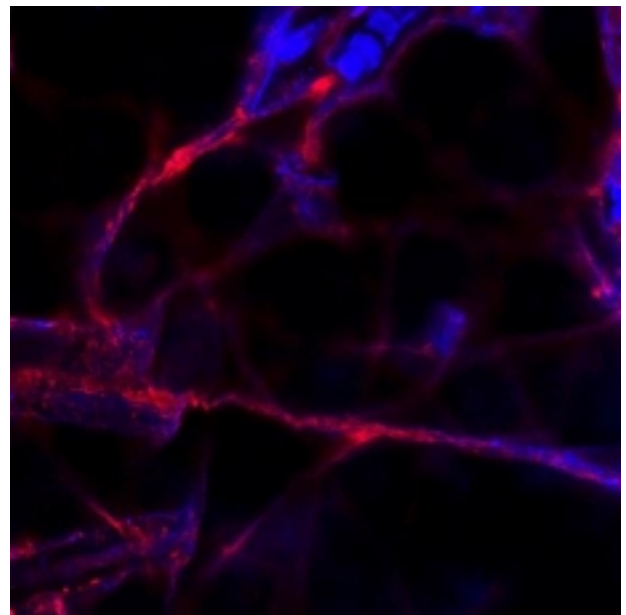


Bild in 6,0 μm Tiefe

Abbildung 45: SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/24/3 mit red-FP – Plasmid-DNS (543 nm/ 633 nm)

Hier sind die Vesikel und die Plasmid-DNS an der Hautoberfläche sehr deutlich zu sehen. Die weitgehend gemeinsame Lokalisation von rot und blau gefärbten Bereiche in 6,0 μm Tiefe ist dadurch zu erklären, daß sich die DNS nur zusammen mit den Vesikeln in tiefere Stratum corneum Schichten gelangt.

7 ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION UND AUSBLICK

Ziel der Arbeit war es, flexible kationische Lipidvesikel zu entwickeln, die für den transdermalen Transport von DNS geeignet ist. Grundlage für dieses Vorhaben war die Tatsache, daß der transdermale Transport zahlreicher niedermolekularer Moleküle, aber auch von Proteinen, mit Hilfe flexibler Lipidvesikel in der Literatur beschrieben wurde (s. 4.2).

Für die Herstellung von positiv geladenen Vesikeln sind in der Literatur zahlreiche kationische Lipide beschrieben (s. 4.1.2.4), weshalb zu Beginn dieser Arbeit eine Auswahl getroffen werden mußte. Dabei stand anfangs die Überlegung, daß die herzustellenden Lipidvesikel bei Verwendung von SPC und *einem* weiteren Molekül *zwei* notwendige Eigenschaften aufweisen sollten: einerseits mußten die Vesikel durch die Verwendung dieses Moleküls positiv geladen sein, um die negativ geladene DNS binden zu können; andererseits sollte es die Vesikel flexibel machen, damit diese Träger die sehr engen Poren in der Haut überwinden können. Lassen sich diese beiden Eigenschaften in einem Molekül kombinieren, wäre dies v.a. für *in vivo* Experimente eine wesentliche Vereinfachung. Das liegt daran, daß sich Vesikel aus drei oder mehr Bestandteilen durch das Eintrocknen auf der Haut deutlich in ihrer Zusammensetzung ändern können, was v.a. an der unterschiedlichen CMC der beteiligten Stoffe liegt.

Um eine ausreichende Flexibilität zu erreichen, war es nötig, bei Verwendung eines großen hydrophilen Kopfes einen hydrophoben Rest zu wählen, der einen deutlich geringeren Raumbedarf hat. Die zweikettigen Lipide, wie z.B. DOTAP, kamen daher nicht in die engere Wahl. Zu Beginn der Arbeit fiel die Wahl auf das einkettige Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB). Dieses Detergens ist mit seiner raumbeanspruchenden Trimethylammonium-Kopfgruppe als quartäres Amin positiv geladen, während die lange C₁₆-Kette für eine ausreichende Verankerung des Detergens in der Membran sorgt.

Durch den Einsatz von CTAB und SPC im molaren Verhältnis von 3/2 ließen sich flexible kationische Vesikel herstellen, die Flexibilität dieser Träger war vergleichbar mit der flexibler anionischer Vesikel (s. 6.6.1).

In der Literatur sind verschiedene morphologische Strukturen von DNS und kationischen Vesikeln zu finden (s. 4.1.2.4). Die Struktur der kationischen Vesikel wird dabei durch die Wechselwirkung der DNS mit den Vesikeln meist stark verändert. Der Erhalt von Struktur und Flexibilität der kationischen Lipidvesikel ist Voraussetzung für den erfolgreichen *in vivo* Einsatz flexibler DNS-Vesikelkomplexe. Daher mußten die Konzentration von DNS und flexiblen Vesikeln sowie die Länge der DNS-Moleküle so gewählt werden, daß ein DNS-Molekül nach seinem Erstkontakt mit einem Vesikel nur Gelegenheit hat, sich komplett um einen flexiblen Vesikel herum anzulagern und keine Möglichkeit besteht, Kontakt zu weiteren Vesikeln aufzunehmen. Das reduziert das Risiko, daß ein DNS-Molekül mehrere flexible Vesikel

miteinander verbindet bzw. daß Vesikel fusionieren. Daher wurde zur Untersuchung der DNS-Adsorption an die CTAB-Vesikel eine Vesikelsuspension mit einem Gesamtlipidgehalt von 0,2 % vorgelegt und dieser mit Hilfe eines Titrators in kleinen Portionen DNS-Lösung in einer Konzentration von 0,3 mg/ml zugegeben. Dabei ergab sich, daß der Prozeß der DNS-Adsorption an die Vesikel nicht mit Beenden der Zugabe von DNS abgeschlossen war, sondern sich noch über Stunden danach fortsetzte. Der Prozeß der DNS-Adsorption war umso schneller beendet, je höher das Ladungsverhältnis von DNS zu Lipid und je höher der Gesamtlipidgehalt war. Die Flexibilität der Vesikel nahm durch die Beladung mit DNS deutlich ab, außerdem war die DNS nach der Passage von 50 nm Polycarbonatporen nicht quantitativ im Filtrat wiederzufinden. Die Größenmessung dieser mit DNS beladenen Lipidvesikel mittels Photonenkorrelationsspektroskopie zeigte, daß die vesikuläre Struktur dieser Lipidvesikel zwar erhalten blieb, der Durchmesser jedoch innerhalb kurzer Zeit nach der Bindung stark anstieg und auch die Homogenität der Vesikelsuspension durch die Bindung von DNS deutlich schlechter wurde. Dies deutet darauf hin, daß die Adsorption von DNS an dieses System zu einer Fusion der Vesikel führt, was die Suche nach einem neuen System notwendig machte.

In einem zweiten Ansatz wurden die beiden Eigenschaften Flexibilität und Ladungsträger auf zwei Bestandteile verteilt, deren CMC sich jedoch nicht wesentlich unterschied (s. 6.1): während Polysorbat, ein nichtionisches Tensid, für die nötige Flexibilität der Vesikel sorgte, wurde DC-Chol als Ladungsträger zugesetzt. DC-Chol ist ein kationisches Cholesterolderivat, das durch seinen Cholesterolrest fest in der Membran verankert ist und durch die tertiäre Amingruppe pH-abhängig geladen ist. Die Verwendung von DC-Chol könnte auch den Vorteil haben, daß bei dem pH-Wert, der beim Mischen herrscht, eine Assoziation von kationischem Detergens und anionischer DNS möglich ist und diese Assoziation auch beim Auftragen der Formulierung auf die Haut (pH-Wert an der Hautoberfläche ca. 5,5) erhalten bleibt, die Dissoziation der beiden Bestandteile unter *in vivo* Bedingungen, d.h. in tieferen Hautschichten, aber erleichtert wird. Je tiefer die flexiblen Vesikel in die Haut penetrieren, desto mehr nähert sich der dort herrschende pH-Wert dem physiologischen pH-Wert von 7,4, der zugleich den pK_S – Wert von DC-Chol in der Membran darstellt.

Bei der Verwendung unterschiedlicher Mengenverhältnisse an SPC, Polysorbat und DC-Chol zeigte die Analytik der entstandenen Vesikel, daß die Menge an DC-Chol, die in die Vesikelmembran inkorporierbar ist, auf etwa 13 mol % (bezogen auf SPC) begrenzt ist. Die Vesikel aus SPC, Polysorbat und DC-Chol sind aufgrund der versteifenden Wirkung von DC-Chol weniger flexibel als die CTAB-Vesikel.

Die Adsorptionskinetik von DNS an SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel unterscheidet sich deutlich von der bei SPC-CTAB – Vesikeln: die DNS-Adsorption an die SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel scheint nach dem Beenden der Zugabe von DNS beendet zu sein.

Mißt man die Größe der entstandenen DNS-Vesikel, wächst der Durchmesser der Vesikel mit zunehmender DNS – Menge direkt nach der DNS – Zugabe und auch die Homogenität der Vesikelsuspensionen verschlechtert sich etwas. Bei keiner der getesteten Formulierungen ist ein Anwachsen des Partikelradius um mehr als das 1,4-fache festzustellen, wodurch eine Fusion der Vesikel ausgeschlossen werden kann. Außerdem ist die Größenzunahme der mit DNS beladenen SPC-Polysorbat-DC-Chol – Lipidvesikel vom Gesamtlipidgehalt der verwendeten Lipidsuspension unabhängig und ändert sich im Verlauf des Beobachtungszeitraums von 4 Monaten nur unwesentlich.

Eine Erhöhung des Polysorbat – Anteils in den Formulierungen hat zur Folge, daß es erst bei einem weitaus höheren DNS-Lipid – Ladungsverhältnis zu einer merklichen Größenzunahme der DNS-Lipid-Partikel kommt. Die Erhöhung des Polysorbat-Anteils führt außerdem zu einer breiteren Verteilung der Partikelgröße und – in Kombination mit DC-Chol – zu einem Partikelwachstum der nicht mit DNS beladenen Vesikel.

Die Passage von mit DNS beladenen SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikeln durch Filter mit einer Porengröße von 30 nm ist bei geeigneter Wahl der Versuchsparameter möglich, wobei sowohl die einzelnen Bestandteile der kationischen Vesikel, als auch die DNS 30 nm Filter quantitativ passieren. Dies kann als Indiz für die Tauglichkeit dieser Komplexe für *in vivo* Anwendungen gewertet werden.

Grundsätzlich waren die polysorbathaltigen Formulierungen fähig, Zellen *in vitro* zu transfizieren, wenn auch weit weniger effizient als die Positivkontrolle mit Fugene. Die Transfektionseffizienz war nicht vom eingesetzten Gesamtlipidgehalt abhängig. Sie war umso höher, je mehr DNS bzw. kationisches Lipid verwendet wurde. Erhöhte man den Polysorbat-Anteil auf mehr als 66 mol % (bezogen auf SPC), wirkten die daraus hergestellten Komplexe *in vitro* jedoch toxisch. Diese Beobachtung läßt sich durch die starke Verdünnung der DNS-Vesikel und des damit verbundenen höheren Anteils an freiem Polysorbat im Kulturmedium erklären, erlaubt jedoch keine Schlußfolgerungen für die *in vivo* Toxizität dieser Formulierungen, da dort der Anteil an freiem Polysorbat während des Eintrocknens der Formulierung auf der Haut abnimmt.

Zur Überprüfung des *in vivo* Verhaltens dieser mit DNS beladenen Vesikel wurden SPC-Polysorbat-DC-Chol – Vesikel und DNS mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, die verwendete DNS codierte für einen Fluoreszenzfarbstoff. Die so markierten Formulierungen wurden NMRI – Mäusen intra- bzw. epicutan appliziert. Etwa 42 Stunden nach der Applikation wurden die Tiere euthanasiert und Biopsien der behandelten Hautareale entnommen.

Dabei zeigte sich, daß DNS mit Hilfe der kationischen Vesikel bis in einer Tiefe von 7 – 8 µm nachweisbar waren, wobei in der Penetrationstiefe von unbeladenen und mit DNS beladenen Vesikeln kein signifikanter Unterschied bestand. Ein Transport von DNS mit ungeladenen flexiblen Vesikeln war ebenso wenig möglich wie die Applikation von DNS ohne kationische Vesikel, in beiden Fällen dringt die DNS maximal 2 µm tief in die Haut ein. Bislang wurde jedoch noch keine Transfektion der Hautzellen beobachtet, auch nicht im Fall der Injektion. Um diesbezüglich Abhilfe zu schaffen, wird es erforderlich sein, das Konstrukt molekularbiologisch zu verbessern. Die fehlende Expression der epicutan applizierten Formulierungen könnte auch daran liegen, daß die DNS nicht tief genug, also bis in die Basalzellschicht, gelangte und macht die Suche nach einem geeigneteren System notwendig.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die Anwesenheit von Polysorbat in der Membran nicht nur für die Flexibilität der Vesikel zwingend notwendig war, sondern v.a. für die Stabilität der Vesikel nach der Anlagerung von DNS. Die Ergebnisse der *in vitro* Flexibilitätstests zeigten, daß die Flexibilität des Trägersystems deutlich abnimmt, wenn dieses mit der DNS beladen wurde. Daher ist es für weitere Ansätze notwendig, den unbeladenen Vesikel eine extrem hohe Flexibilität zu verleihen, um selbst nach der Bindung der DNS an diese Träger noch eine ausreichende Flexibilität zu erhalten. Dies macht den Ersatz des membranversteifenden DC-Chols durch ein anderes kationisches Detergens notwendig. Ein denkbarer Ansatz wäre z.B. der Ersatz durch ein zweikettiges kationisches Lipid oder die Verwendung von CTAB statt DC-Chol. Das CTAB/SPC – System erwies sich zwar als ungeeignet für die Herstellung flexibler Vesikel, die ihre Größe auch bei DNS-Adsorption nicht wesentlich verändern, aber der Zusatz von Polysorbat zu diesem System könnte dafür sorgen, daß das rasche Ansteigen des Partikelradius abgeschwächt oder gar verhindert wird. Ob CTAB als einkettiger kationischer Anker dabei ausreichend fest in der Membran verankert ist oder bei der Filtration von DNS-Vesikeln aus der Membran gezogen wird, wäre bei dieser Gelegenheit festzustellen. Grundsätzlich wäre zu überprüfen, ob der Einsatz eines pH-abhängig geladenen tertiären Amins von Nachteil ist. Der Grund dafür könnte sein, daß die DNS für *in vivo* Versuche ausreichend fest an die Vesikel gebunden sein muß, um nicht auf dem Weg zur Basalzellschicht der Haut schon von den Vesikeln abzu dissoziieren. Da der pH – Wert der menschlichen Haut vom Stratum corneum in Richtung Basalzellschicht von etwa 5,5 auf 7,4 ansteigt, besteht beim Einsatz eines tertiären Amins mit einem pK_s – Wert von etwa 7 die Gefahr, daß sich die DNS von den Vesikeln ablöst, bevor sie die Basalzellschicht erreicht.

8 LITERATUR

1. Anderson, W.F., *Human gene therapy*. Nature, 1998. 392(6679 Suppl): p. 25-30.
2. Max-Planck-Gesellschaft, BIOMAX 1, 1995.
3. Urmoneit, B., *Gentherapie - Die Medizin der Zukunft*. Pharmazeutische Zeitung, 2001. 146(7): p. 10-16.
4. Collins, F.S., *Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications*. Science, 1992. 256(5058): p. 774-9.
5. Fuloria, M. and B.K. Rubin, *Evaluating the efficacy of mucoactive aerosol therapy*. Respir Care, 2000. 45(7): p. 868-73.
6. Noguchi, C.T., A.N. Schechter, and G.P. Rodgers, *Sickle cell disease pathophysiology*. Baillieres Clin Haematol, 1993. 6(1): p. 57-91.
7. Kouraklis, G., *Progress in cancer gene therapy*. Acta Oncol, 1999. 38(6): p. 675-83.
8. Gjerset, R.A. and D. Mercola, *Sensitization of tumors to chemotherapy through gene therapy*. Adv Exp Med Biol, 2000. 465: p. 273-91.
9. Wildner, O., *In situ use of suicide genes for therapy of brain tumours*. Ann Med, 1999. 31(6): p. 421-9.
10. Freeman, S.M., *Suicide gene therapy*. Adv Exp Med Biol, 2000. 465: p. 411-22.
11. Osaki, S., et al., *Alteration of drug chemosensitivity caused by the adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene in human lung cancer cells*. Cancer Gene Ther, 2000. 7(2): p. 300-7.
12. Adjei, A.A., *Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy*. J Natl Cancer Inst, 2001. 93(14): p. 1062-74.
13. Kang, U.J., W.Y. Lee, and J.W. Chang, *Gene therapy for Parkinson's disease: determining the genes necessary for optimal dopamine replacement in rat models*. Hum Cell, 2001. 14(1): p. 39-48.
14. Gimenez y Ribotta, M., *Gene therapy strategies in neurodegenerative diseases*. Histol Histopathol, 2001. 16(3): p. 883-93.
15. Sanders, N.N., et al., *On the transport of lipoplexes through cystic fibrosis sputum*. Pharm Res, 2002. 19(4): p. 451-6.
16. Shimada, K., et al., *Biodistribution of liposomes containing synthetic galactose-terminated diacylglycerol-poly(ethyleneglycol)s*. Biochim Biophys Acta, 1997. 1326(2): p. 329-41.
17. Zhou, J.M., et al., *Long-term expression of human factor IX cDNA in rabbits*. Sci China B, 1993. 36(11): p. 1333-41.
18. Alexander, M.Y. and R.J. Akhurst, *Liposome-mediated gene transfer and expression via the skin*. Hum Mol Genet, 1995. 4(12): p. 2279-85.
19. Watt, P.C., M.P. Sawicki, and E. Passaro, Jr., *A review of gene transfer techniques*. Am J Surg, 1993. 165(3): p. 350-4.
20. Bally, M.B., et al., *Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers*. Adv Drug Deliv Rev, 1999. 38(3): p. 291-315.
21. Klein, T.M., et al., *Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment*. Biotechnology (N Y), 1992. 10(3): p. 286-91.
22. Nabel, G.J. and P.L. Felgner, *Direct gene transfer for immunotherapy and immunization*. Trends Biotechnol, 1993. 11(5): p. 211-5.
23. Oliveira, S.C., et al., *Immunological properties of gene vaccines delivered by different routes*. Braz J Med Biol Res, 1999. 32(2): p. 207-14.

24. Yokoyama, M., J. Zhang, and J.L. Whitton, *DNA immunization: effects of vehicle and route of administration on the induction of protective antiviral immunity*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1996. 14(4): p. 221-30.
25. Neumann, E., et al., *Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields*. Embo J, 1982. 1(7): p. 841-5.
26. Davis, B.R., et al., *Micro-injection-mediated hematopoietic stem cell gene therapy*. Curr Opin Mol Ther, 2000. 2(4): p. 412-9.
27. Pari, G.S. and W.A. Keown, *Experimental strategies in efficient transfection of mammalian cells. Calcium phosphate and DEAE-dextran*. Methods Mol Biol, 1997. 62: p. 301-6.
28. Loyter, A., et al., *Mechanisms of DNA entry into mammalian cells. II. Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy*. Exp Cell Res, 1982. 139(1): p. 223-34.
29. Jolly, D., *Viral vector systems for gene therapy*. Cancer Gene Ther, 1994. 1(1): p. 51-64.
30. Fox, J.L., *Gene therapy safety issues come to fore*. Nature Biotechnology, 1999. 1153(17).
31. Igarashi, T., et al., *A novel strategy of cell targeting based on tissue-specific expression of the ecotropic retrovirus receptor gene*. Hum Gene Ther, 1998. 9(18): p. 2691-8.
32. Verma, I.M. and N. Somia, *Gene therapy -- promises, problems and prospects*. Nature, 1997. 389(6648): p. 239-42.
33. Kotin, R.M., *Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy*. Hum Gene Ther, 1994. 5(7): p. 793-801.
34. Kochanek, S., *High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy*. Hum Gene Ther, 1999. 10(15): p. 2451-9.
35. Rabinowitz, J.E. and J. Samulski, *Adeno-associated virus expression systems for gene transfer*. Curr Opin Biotechnol, 1998. 9(5): p. 470-5.
36. Burton, E.A., et al., *Targeting gene expression using HSV vectors*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. 53(2): p. 155-70.
37. Kafri, T., *Lentivirus vectors: difficulties and hopes before clinical trials*. Curr Opin Mol Ther, 2001. 3(4): p. 316-26.
38. Wetzel, K., et al., *Transduction of human MCP-3 by a parvoviral vector induces leukocyte infiltration and reduces growth of human cervical carcinoma cell xenografts*. J Gene Med, 2001. 3(4): p. 326-37.
39. Salmons, B. and W.H. Gunzburg, *Targeting of retroviral vectors for gene therapy*. Hum Gene Ther, 1993. 4(2): p. 129-41.
40. Boussif, O., et al., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(16): p. 7297-301.
41. Garnett, M.C., *Gene-delivery systems using cationic polymers*. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1999. 16(2): p. 147-207.
42. Demeneix, B., et al., *Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines*. Adv Drug Deliv Rev, 1998. 30(1-3): p. 85-95.
43. Dass, C.R. and M.A. Burton, *Lipoplexes and tumours. A review*. J Pharm Pharmacol, 1999. 51(7): p. 755-70.
44. Hui, S.W., et al., *The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer*. Biophys J, 1996. 71(2): p. 590-9.

45. Stamatatos, L., et al., *Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid vesicles and biological membranes*. Biochemistry, 1988. 27(11): p. 3917-25.
46. Felgner, P.L., et al., *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(21): p. 7413-7.
47. Rose, J.K., L. Buonocore, and M.A. Whitt, *A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells*. Biotechniques, 1991. 10(4): p. 520-5.
48. Barthel, F., et al., *Gene transfer optimization with lipospermine-coated DNA*. DNA Cell Biol, 1993. 12(6): p. 553-60.
49. Felgner, P.L., et al., *Improved cationic lipid formulations for in vivo gene therapy*. Ann N Y Acad Sci, 1995. 772: p. 126-39.
50. Gustafsson, J., et al., *Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM*. Biochim Biophys Acta, 1995. 1235(2): p. 305-12.
51. Gao, X. and L. Huang, *A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. 179(1): p. 280-5.
52. Gershon, H., et al., *Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection*. Biochemistry, 1993. 32(28): p. 7143-51.
53. Sternberg, B., F.L. Sorgi, and L. Huang, *New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy*. FEBS Lett, 1994. 356(2-3): p. 361-6.
54. Koltover, I., et al., *An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery*. Science, 1998. 281(5373): p. 78-81.
55. Battersby, B.J., et al., *Evidence for three-dimensional interlayer correlations in cationic lipid-DNA complexes as observed by cryo-electron microscopy*. Biochim Biophys Acta, 1998. 1372(2): p. 379-83.
56. Huebner, S., et al., *Lipid-DNA complex formation: reorganization and rupture of lipid vesicles in the presence of DNA as observed by cryoelectron microscopy*. Biophys J, 1999. 76(6): p. 3158-66.
57. Ferrari, M.E., et al., *Trends in lipoplex physical properties dependent on cationic lipid structure, vehicle and complexation procedure do not correlate with biological activity*. Nucleic Acids Res, 2001. 29(7): p. 1539-48.
58. Wheeler, J.J., et al., *Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization*. Gene Ther, 1999. 6(2): p. 271-81.
59. Yamazaki, Y., et al., *Polycation liposomes, a novel nonviral gene transfer system, constructed from cetylated polyethylenimine*. Gene Ther, 2000. 7(13): p. 1148-55.
60. Hafez, I.M., N. Maurer, and P.R. Cullis, *On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids*. Gene Ther, 2001. 8(15): p. 1188-96.
61. Xu, Y. and F.C. Szoka, Jr., *Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection*. Biochemistry, 1996. 35(18): p. 5616-23.
62. Bebok, Z., et al., *Efficiency of plasmid delivery and expression after lipid-mediated gene transfer to human cells in vitro*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. 279(3): p. 1462-9.
63. Wheeler, C.J., et al., *A novel cationic lipid greatly enhances plasmid DNA delivery and expression in mouse lung*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(21): p. 11454-59.

64. Schoen, P., et al., *Gene transfer mediated by fusion protein hemagglutinin reconstituted in cationic lipid vesicles*. Gene Ther, 1999. 6(5): p. 823-32.
65. Neubert, W. and Marschner, *Dermatopharmazie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2001.
66. Pinnagoda, J., et al., *Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis*. Contact Dermatitis, 1990. 22(3): p. 164-78.
67. Iizuka, H., *Epidermal turnover time*. J Dermatol Sci, 1994. 8(3): p. 215-7.
68. Heisig, M., et al., *Non steady-state descriptions of drug permeation through stratum corneum. I. The biphasic brick-and-mortar model*. Pharm Res, 1996. 13(3): p. 421-6.
69. Bashir, S.J., et al., *Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping*. Skin Res Technol, 2001. 7(1): p. 40-8.
70. Mikulowska, A., *Reactive changes in human epidermis following simple occlusion with water*. Contact Dermatitis, 1992. 26(4): p. 224-7.
71. Warner, R. and N. Lilly, *Correlation of water content with ultrastructure in the stratum corneum*. CRC Press Boca Raton, 1994. in: Bioengineering of the Skin (Elsner P., Berardesca, E. Maibach HI, eds): p. 3-12.
72. Larregina, A.T. and L.D. Faló, Jr., *Generating and regulating immune responses through cutaneous gene delivery*. Hum Gene Ther, 2000. 11(16): p. 2301-5.
73. Hottiger, M.O., et al., *Liposome-mediated gene transfer into human basal cell carcinoma*. Gene Ther, 1999. 6(12): p. 1929-35.
74. Cao, T., X.J. Wang, and D.R. Roop, *Regulated cutaneous gene delivery: the skin as a bioreactor*. Hum Gene Ther, 2000. 11(16): p. 2297-300.
75. Hengge, U. and B. Volc-Platzter, *The Skin and Gene Therapy*. Springer Verlag Berlin, 2001.
76. Yarosh, D., et al., *Localization of liposomes containing a DNA repair enzyme in murine skin*. J Invest Dermatol, 1994. 103(4): p. 461-8.
77. Uitto J, Pulkkinen L, and C. AM, *Molecular basis of the dystrophic and junctional forms of epidermolysis bullosa: mutations in the type VII collagen and kalinin (laminin 5) genes*. J Invest Dermatol, 1994. Nov;103((5 Suppl)): p. 39S-46S.
78. Khavari, P.A., *Gene therapy for genetic skin disease*. J Invest Dermatol, 1998. 110(4): p. 462-7.
79. Choate KA, et al., *Corrective gene transfer in the human skin disorder lamellar ichthyosis*. Nat Med, 1996. Nov(2 (11)): p. 1263-7.
80. Supp, D.M., et al., *Genetic modification of cultured skin substitutes by transduction of human keratinocytes and fibroblasts with platelet-derived growth factor-A*. Wound Repair Regen, 2000. 8(1): p. 26-35.
81. Kageshita, T., et al., *Growth inhibition of human malignant melanoma transfected with the human interferon-beta gene by means of cationic liposomes*. Melanoma Res, 2001. 11(4): p. 337-42.
82. Ulmer, J.B., et al., *Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein*. Science, 1993. 259(5102): p. 1745-9.
83. Faló, L.D., Jr., *Targeting the skin for genetic immunization*. Proc Assoc Am Physicians, 1999. 111(3): p. 211-9.
84. Robinson, H.L., *DNA vaccines: basic mechanism and immune responses (Review)*. Int J Mol Med, 1999. 4(5): p. 549-55.
85. Morgan, J.R., et al., *Expression of an exogenous growth hormone gene by transplantable human epidermal cells*. Science, 1987. 237(4821): p. 1476-9.

86. White, S.J., et al., *Long-term expression of human clotting factor IX from retrovirally transduced primary human keratinocytes in vivo*. Hum Gene Ther, 1998. 9(8): p. 1187-95.
87. Naffakh, N., et al., *Sustained delivery of erythropoietin in mice by genetically modified skin fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(8): p. 3194-8.
88. Cevc, G., *Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery*. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996. 13(3-4): p. 257-388.
89. Schatzlein, A. and G. Cevc, *Non-uniform cellular packing of the stratum corneum and permeability barrier function of intact skin: a high-resolution confocal laser scanning microscopy study using highly deformable vesicles (Transfersomes)*. Br J Dermatol, 1998. 138(4): p. 583-92.
90. Planas, M.E., et al., *Noninvasive percutaneous induction of topical analgesia by a new type of drug carrier, and prolongation of local pain insensitivity by anesthetic liposomes*. Anesth Analg, 1992. 75(4): p. 615-21.
91. Paul, A., G. Cevc, and B.K. Bachhawat, *Transdermal immunization with large proteins by means of ultradeformable drug carriers*. Eur J Immunol, 1995. 25(12): p. 3521-4.
92. Cevc, G., et al., *Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin*. Biochim Biophys Acta, 1998. 1368(2): p. 201-15.
93. Brunner, U., *Neuer Transporter schleust Interferon durch die Haut*. Pharmazeutische Zeitung, 2001(5/01).
94. Voet, V.a., *Biochemie*. VCH Verlag Weinheim, 1994.
95. Podgornik, R., et al., *Watching molecules crowd: DNA double helices under osmotic stress*. Biophys Chem, 1995. 57(1): p. 111-21.
96. Zuidam, N.J., Y. Barenholz, and A. Minsky, *Chiral DNA packaging in DNA-cationic liposome assemblies*. FEBS Lett, 1999. 457(3): p. 419-22.
97. Wu, H.M., N. Dattagupta, and D.M. Crothers, *Solution structural studies of the A and Z forms of DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. 78(11): p. 6808-11.
98. Hershey, A.D. and E. Burgi, *Molecular homogeneity of the DNA of phage T2*. J. Mol. Biol., 1960. 2: p. 143-152.
99. Lasic, D.D., *Liposomes in gene delivery*. CRC Press, 1997.
100. Manning, G.S., *The molecular Theory of Polyelectrolyte Solutions with application to the Electrostatic properties of Polynucleotides*. Q. Rev. Biophys., 1978. 11: p. 179-246.
101. Cevc, *Phospholipids Handbook*. M. Decker, New York, 1993.
102. Bhairi, S., *Detergents - A guide to the properties and uses of detergents in biological systems*. Broschüre von Calbiochem, 1997.
103. Zuidam, N.J. and Y. Barenholz, *Electrostatic parameters of cationic liposomes commonly used for gene delivery as determined by 4-heptadecyl-7-hydroxycoumarin [published erratum appears in Biochem Biophys Acta 1998 Jun 24;1372(1):151]*. Biochim Biophys Acta, 1997. 1329(2): p. 211-22.
104. Avanti, *Spezifikation für SPC aus dem Produkt-Katalog*. 2001: p. 47.
105. Huebner, S., et al., *EDTA-induced self-assembly of cationic lipid-DNA multilayers near a monolayer-covered air-water interface*. Biochim Biophys Acta, 1999. 1421(1): p. 1-4.
106. Ostrowsky, *Liposome size measurements by photon correlation spectroscopy*. Chemistry and Physics of Lipids, 1992. 64: p. 45-56.

107. Cevc, [persönliche Kommunikation].
108. Sorgi, F.L. and L. Huang, *Large scale production of DC-Chol cationic liposomes by microfluidization*. International Journal of Pharmaceutics, 1996. 144: p. 131 - 139.
109. Rendina, G., *Experimental Methods in Modern Biochemistry*. Saunders Philadelphia, 1971, 1971.
110. Boyde, A., et al., *High temporal and spatial resolution studies of bone cells using real-time confocal reflection microscopy*. Scanning, 1994. 16(5): p. 285-94.
111. Firma Zeiss, *Broschüre zum LSM 510*. 2001.
112. Oberle, V., et al., *Lipoplex formation under equilibrium conditions reveals a three-step mechanism*. Biophys J, 2000. 79(3): p. 1447-54.
113. Wilhelm, K.P., B. Bottjer, and C.P. Siegers, *Quantitative assessment of primary skin irritants in vitro in a cytotoxicity model: comparison with in vivo human irritation tests*. Br J Dermatol, 2001. 145(5): p. 709-15.
114. Toulou, E., et al., *Intracellular delivery mediated by an ethosomal carrier*. Biomaterials, 2001. 22(22): p. 3053-9.
115. Kirjavainen, M., et al., *Interaction of liposomes with human skin in vitro--the influence of lipid composition and structure*. Biochim Biophys Acta, 1996. 1304(3): p. 179-89.
116. Betz, G., R. Imboden, and G. Imanidis, *Interaction of liposome formulations with human skin in vitro*. Int J Pharm, 2001. 229(1-2): p. 117-29.
117. van Kuijk-Meuwissen, M.E., et al., *Application of vesicles to rat skin in vivo: a confocal laser scanning microscopy study*. J Control Release, 1998. 56(1-3): p. 189-96.

9 ANHANG

Anhang 1: CMC-Bestimmung von CTAB

Farbstoff DPH (n = 1)	
c _{CTAB} [mM]	Fluoreszenz
0,0001	15,47
0,001	26,23
0,01	38,44
0,10	43,65
0,15	111,0
0,20	443,5
0,30	803,3

Anhang 2: CMC-Bestimmung von DC-Chol

Fluoreszenzfarbstoff PNA (jeweils n = 6)					
DC-Chol [μM]	Fluoreszenz (Messung 1)		DC-Chol [μM]	Fluoreszenz (Messung 2)	
	Mittelwert	rel. St.abw. [%]		Mittelwert	rel. St.abw. [%]
0,0	39,5	1,0	0,0	33,7	0,8
0,2	42,6	2,0	0,2	35,5	5,0
0,4	49,2	1,3	0,3	38,8	0,7
0,6	55,6	2,1	0,5	38,5	0,7
0,8	59,1	3,6	0,6	42,1	1,6
4,0	85,5	5,0	0,8	42,3	0,9
8,0	121,0	6,3	12,0	268,5	2,2
16,0	215,9	2,6	16,0	364,7	1,4
24,0	309,6	5,3	20,0	480,7	2,3
32,0	401,2	5,2			

Fluoreszenzfarbstoff DPH (jeweils n = 6)					
DC-Chol [μM]	Fluoreszenz (Messung 1)		DC-Chol [μM]	Fluoreszenz (Messung 2)	
	Mittelwert	rel. St.abw. [%]		Mittelwert	rel. St.abw. [%]
0,0	20,5	0,6	0,00	17,2	1,1
0,2	20,4	0,7	0,16	17,6	1,6
0,4	20,9	3,3	0,40	18,6	0,7
0,6	21,6	2,3	0,60	18,7	2,3
0,8	25,9	8,5	0,80	18,1	4,5
8,0	103,6	2,8	8,00	71,7	1,3
12,0	155,5	1,3	12,00	137,5	2,1
16,0	205,8	0,9	16,00	181,6	2,0
20,0	254,5	1,2	20,00	196,3	3,7
24,0	304,3	1,5			

Anhang 3: Ansätze für die Solubilisierungskurve von SPC-Liposomen mit CTAB

n _{CTAB} / n _{SPC}	m _{CTAB} [g]	m _{SPC} [g]	m _{Puffer} [g]	TL [%]	A _{550 nm}	n _{CTAB} / n _{SPC}	m _{CTAB} [g]	m _{SPC} [g]	m _{Puffer} [g]	TL [%]	A _{550 nm}
10 % SPC – Anteil						5 % SPC – Anteil					
0,80	0,0365	0,1000	0,9000	13,2	3,135	0,80	0,0182	0,0500	0,9500	6,7	3,135
1,00	0,0456	0,1000	0,9000	13,9	3,068	1,00	0,0228	0,0500	0,9500	7,1	3,068
1,25	0,0570	0,1000	0,9000	14,8	2,799	1,25	0,0285	0,0500	0,9500	7,6	2,799
1,50	0,0683	0,1000	0,9000	15,8	0,989	1,50	0,0342	0,0500	0,9500	8,1	0,989
1,75	0,0797	0,1000	0,9000	16,6	3,039	1,75	0,0399	0,0500	0,9500	8,6	3,039
2,00	0,0911	0,1000	0,9000	17,5	2,613	2,00	0,0456	0,0500	0,9500	9,1	2,613
2,50	0,1139	0,1000	0,9000	19,2	0,820	2,50	0,0570	0,0500	0,9500	10,1	0,820
3,00	0,1367	0,1000	0,9000	20,8	0,604	3,00	0,0683	0,0500	0,9500	11,1	0,604

Anhang 4: Kinetikmessung der Adsorption von DNS an CTAB – Vesikel (TL = 0,2 %)

Zeit	Ansatz 1				Ansatz 2					Ansatz 3	
	Transmission nach Zugabe von ... DNS										
[min]	0,6 mg	1,2 mg	1,8 mg	3,0 mg	0,6 mg	1,2 mg	1,8 mg	2,4 mg	3,0 mg	1,2 mg	2,4 mg
0	64,350	54,858	36,285	33,228	67,017	58,153	44,428	36,357	13,500	-	-
1	66,373	54,781	44,393	28,713	67,101	60,430	45,527	36,623	18,095	65,778	50,665
2	66,429	54,746	47,522	29,488	67,073	60,318	45,331	36,581	18,837	65,680	50,406
3	66,359	54,704	47,487	30,974	67,080	60,192	45,331	36,518	11,200	65,659	50,266
4	66,352	54,662	47,025	30,365	67,017	60,248	45,282	36,385	13,671	65,477	50,105
5	66,345	54,627	46,962	31,611	66,968	60,108	45,282	36,350	15,813	65,477	49,832
10	66,093	54,466	46,808	30,302	66,821	59,716	44,827	35,818	17,885	65,008	49,027
20	65,813	54,025	46,115	30,288	66,555	58,876	44,141	35,048	23,121	64,189	47,543
30	65,470	53,727	45,429	29,392	66,149	58,085	43,623	34,362	22,477	63,433	46,276
45	-	-	-	-	65,764	57,217	42,699	33,613	23,604	62,481	44,771
60	64,686	52,674	43,658	27,761	65,431	56,265	42,083	32,934	23,562	61,599	43,560
75	-	-	-	-	65,043	55,516	41,418	32,311	23,212	60,766	42,454
90	-	51,981	42,391	26,578	64,728	54,928	41,005	31,856	23,142	60,143	41,600
105	-	-	-	-	64,469	54,319	40,599	31,443	22,806	59,541	40,879
120	-	51,351	41,488	25,850	64,161	53,829	40,193	30,960	22,617	58,939	40,284
135	-	-	-	-	63,937	53,353	39,822	30,715	22,505	58,533	39,773
150	-	51,078	40,725	25,276	63,713	52,905	39,605	30,540	22,323	58,092	39,374
165	-	-	-	-	63,489	52,527	39,306	30,302	22,274	57,658	38,926
180	-	50,553	40,193	24,889	63,279	52,128	39,157	30,043	22,203	57,315	38,604
195	-	-	-	-	63,181	51,841	38,744	29,994	22,155	56,958	38,268
210	-	50,217	39,731	24,577	62,985	51,568	38,618	29,721	22,057	56,727	38,030
225	-	-	-	-	62,782	51,190	38,387	29,567	22,015	56,384	37,652
240	-	50,000	39,332	24,402	-	-	-	-	21,994	56,167	37,372

Anhang 5: Kinetikmessung der DNS-Adsorption an CTAB – Vesikel (TL = 0,6 %)

Zeit	Ansatz 4					
	Transmission nach Zugabe von ... DNS					
[min]	0,6 mg	1,2 mg	1,8 mg	2,4 mg	3,0 mg	3,6 mg
0	-	30,029	29,609	27,719	25,269	22,617
5	-	29,889	29,350	27,390	24,976	22,295
10	-	29,791	29,126	27,068	24,640	22,001
20	-	29,595	28,664	26,564	24,129	21,476
30	-	29,399	28,328	26,172	23,646	21,056
45	-	29,210	27,880	25,668	23,100	20,531
60	-	29,014	27,565	25,228	22,701	20,139

Anhang 6: Größenmessung von DNS-CTAB – Vesikeln (TL = 0,2 %)

Cum 2 – Analyse					Contin – Analyse				
Messung 1 (2 Proben je 2x vermessen)					Messung 1 (2 Proben je 2x vermessen)				
mg DNS	direkt n. Mischen		1 Tag n. Mischen		mg DNS	direkt n. Mischen		1 Tag n. Mischen	
	Rad. [nm]	PI	Rad. [nm]	PI		Rad. [nm]	rel. Br.	Rad. [nm]	rel. Br.
0,0	54,7	0,10	-	-	0,0	60,1	0,26	-	-
0,6	61,1	0,10	91,6	0,41	0,6	66,8	0,24	102,7	0,07
1,2	88,4	0,40	108,5	0,80	1,2	109,4	0,54	149,7	1,20
1,8	106,3	0,60	125,5	1,06	1,8	135,6	0,55	164,7	0,43
2,4	-	-	-	-	2,4	-	-	-	-
3,0	165,0	1,81	-	-	3,0	229,6	0,67	-	-
Messung 2 (2 Proben je 2x vermessen)					Messung 2 (2 Proben je 2x vermessen)				
mg DNS	direkt n. Mischen		1 Tag n. Mischen		mg DNS	Direkt n. Mischen		1 Tag n. Mischen	
	Rad. [nm]	PI	Rad. [nm]	PI		Rad. [nm]	rel. Br.	Rad. [nm]	rel. Br.
0,0	54,7	0,10	-	-	0,0	60,1	0,26	-	-
0,6	69,5	0,17	81,8	0,38	0,6	75,9	0,28	114,5	1,09
1,2	92,2	0,35	113,8	0,89	1,2	103,2	0,20	148,3	0,79
1,8	106,3	0,56	125,8	1,25	1,8	133,5	0,50	176,7	0,50
2,4	126,3	0,90	152,3	1,56	2,4	192,0	0,39	221,8	0,54
3,0	147,8	1,30	-	-	3,0	204,0	0,48	-	-

Anhang 7: Zusammensetzung der untersuchten DNS-DC-Chol – Vesikel

Ladungsverhältnis DNS : DC-Chol	Volumina	SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/4		
		TL 10 %	TL 5 %	TL 1 %
1 : 12	Vesikel [µl]	300,0	300,0	600,0
	DNS [µl]	168,7	84,4	33,8
1 : 24	Vesikel [µl]	300,0	300,0	600,0
	DNS [µl]	84,4	42,2	16,9
1 : 47	Vesikel [µl]	300,0	300,0	600,0
	DNS [µl]	42,2	21,1	8,4
1 : 237	Vesikel [µl]	300,0	300,0	600,0
	DNS [µl]	8,4	4,2	1,7

Anhang 8: Größen und PI verschiedener DNS-DC-Chol – Vesikel

Probe	Ladungsverhältnis DNS : DC-Chol	Kumulanten- Analyse		Contin- Analyse	
		r [nm]	PI	r [nm]	[rel.Br.]
Vesikel 10 % TL		79,1	0,07	80,3	0,07
Vesikel 5 % TL		75,3	0,03	75,9	0,04
Vesikel 1 % TL		71,2	0,05	68,1	0,03
lange DNS, 10 % TL	1/237	79,7	0,05	79,5	0,06
lange DNS, 10 % TL	1/ 47	83,9	0,14	86,2	0,15
lange DNS, 10 % TL	1/ 24	86,1	0,19	80,0	0,06
lange DNS, 10 % TL	1/ 12	102,3	0,51	86,9	0,12
lange DNS, 5 % TL	1/237	76,9	0,10	76,3	0,07
lange DNS, 5 % TL	1/ 47	77,5	0,14	79,9	0,14
lange DNS, 5 % TL	1/ 24	83,1	0,18	75,9	0,07
lange DNS, 5 % TL	1/ 12	99,6	0,54	76,4	0,07
lange DNS, 1 % TL	1/237	71,8	0,08	73,8	0,08
lange DNS, 1 % TL	1/ 47	75,5	0,09	72,9	0,07
lange DNS, 1 % TL	1/ 24	78,9	0,21	76,9	0,13
lange DNS, 1 % TL	1/ 12	91,3	0,41	81,6	0,18
Plasmid-DNS, 10 % TL	1/237	78,4	0,08	77,6	0,06
Plasmid-DNS, 10 % TL	1/ 47	79,2	0,11	80,2	0,09
Plasmid-DNS, 10 % TL	1/ 24	83,2	0,12	85,6	0,09
Plasmid-DNS, 10 % TL	1/ 12	89,4	0,17	86,5	0,07
Plasmid-DNS, 5 % TL	1/237	76,5	0,03	75,5	0,03
Plasmid-DNS, 5 % TL	1/ 47	77,0	0,05	76,6	0,06
Plasmid-DNS, 5 % TL	1/ 24	78,4	0,13	79,7	0,10
Plasmid-DNS, 5 % TL	1/ 12	84,4	0,18	85,6	0,15
Plasmid-DNS, 1 % TL	1/237	71,7	0,07	74,4	0,07
Plasmid-DNS, 1 % TL	1/ 47	74,2	0,07	75,1	0,08
Plasmid-DNS, 1 % TL	1/ 24	75,1	0,15	83,5	0,25
Plasmid-DNS, 1 % TL	1/ 12	83,8	0,18	81,7	0,12
kurze DNS, 10 % TL	1/237	79,2	0,04	78,9	0,03
kurze DNS, 10 % TL	1/ 47	80,3	0,11	81,9	0,10
kurze DNS, 10 % TL	1/ 24	84,1	0,16	88,2	0,09
kurze DNS, 10 % TL	1/ 12	95,3	0,34	95,9	0,11
kurze DNS, 5 % TL	1/237	75,0	0,04	73,3	0,04
kurze DNS, 5 % TL	1/ 47	77,7	0,14	76,7	0,06
kurze DNS, 5 % TL	1/ 24	82,7	0,18	81,2	0,10
kurze DNS, 5 % TL	1/ 12	95,4	0,36	95,3	0,18
kurze DNS, 1 % TL	1/237	73,2	0,04	70,7	0,04
kurze DNS, 1 % TL	1/ 47	76,3	0,07	77,7	0,10
kurze DNS, 1 % TL	1/ 24	79,2	0,16	78,5	0,12
kurze DNS, 1 % TL	1/ 12	85,7	0,28	82,8	0,13

Anhang 9: Größen und PI verschiedener mit Plasmid-DNS beladener DC-Chol – Vesikel

Ladungsverhältnis DNS : DC-Chol	Radien					PI				
	0	1:237	1:47	1:24	1:12	0	1:237	1:47	1:24	1:12
0 Tage	79,1	78,4	79,2	83,2	89,4	0,07	0,08	0,11	0,12	0,17
36 Tage	85,4	84,6	84,1	85,9	92,9	0,08	0,05	0,06	0,15	0,18
61 Tage	89,6	91,8	89,2	91,5	98,4	0,06	0,09	0,13	0,14	0,24
90 Tage	95,0	96,4	93,8	95,2	102,3	0,06	0,09	0,09	0,17	0,23
124 Tage	96,2	94,8	92,2	94,3	98,9	0,18	0,10	0,07	0,17	0,25

Anhang 10: Größen und PI verschiedener DNS-DC-Chol – Vesikel (30/ 24/ z)

	SPC/Polysorbat/DC-Chol je 200 µl (10 % TL)	Bemerkungen/ (Plasmid-DNS; c = 1 µg/µl)	Tag 0		Tag 52	
			Cum 2 - Analyse		Cum 2 - Analyse	
			r [nm]	PI	r [nm]	PI
ohne DNS	30/ 24/ 0	nach der Herstellung	56,7	0,03	62,4	0,07
		Herstellung + 2 Tage	55,5	0,04		
		Herstellung + 2 Tage + erneute Filtration	55,7	0,03		
	30/ 24/ 3	nach der Herstellung	58,1	0,02	84,9	0,17
		Herstellung + 2 Tage	77,0	0,07		
		Herstellung + 2 Tage + erneute Filtration	73,1	0,06		
	30/ 24/ 6	nach der Herstellung	59,1	0,04	109,8	0,38
		Herstellung + 2 Tage	110,2	0,36		
		Herstellung + 2 Tage + erneute Filtration	77,3	0,10		
mit DNS	30/ 24/ 0	2,89 µg DNS	56,6	0,04	61,0	0,05
		14,46 µg DNS	56,6	0,03	59,3	0,03
		28,92 µg DNS	56,6	0,05	58,7	0,03
		57,84 µg DNS	55,7	0,05	56,5	0,04
	30/ 24/ 3	2,89 µg DNS	77,4	0,10	85,2	0,13
		14,46 µg DNS	75,7	0,08	83,8	0,10
		28,92 µg DNS	77,2	0,08	80,4	0,12
		57,84 µg DNS	81,3	0,12	83,5	0,16
	30/ 24/ 6	5,64 µg DNS	112,0	0,39	110,8	0,43
		28,18 µg DNS	113,3	0,33	110,0	0,46
		56,36 µg DNS	111,0	0,34	122,8	0,52
		112,71 µg DNS	123,8	0,47	130,8	0,58

Anhang 11: Analytik der DNS-CTAB – Vesikel

	Anal.lsg. [µL]	Puffer [µL]	Isoprop. [µL]	A_{232nm}	A_{260nm}
Vesikel (TL = 0,2 %) (vor und nach PA)	150	350	500	0,234	0,037
	350	150	500	0,523	0,083
	500	0	500	0,763	0,125
reine DNS – Lsg.	150	350	500	0,048	0,110
	350	150	500	0,108	0,257
	500	0	500	0,160	0,374
DNS-CTAB – Vesikel vor PA	150	350	500	0,259	0,153
	350	150	500	0,590	0,356
	500	0	500	0,863	0,528
DNS-CTAB – Vesikel nach 0,2 MPa	150	350	500	0,213	0,081
	350	150	500	0,467	0,180
	500	0	500	0,692	0,265
DNS-CTAB – Vesikel nach 0,5 MPa	150	350	500	0,245	0,102
	350	150	500	0,507	0,217
	500	0	500	0,779	0,329
DNS-CTAB – Vesikel nach 1,0 MPa	150	350	500	0,251	0,135
	350	150	500	0,566	0,309
	500	0	500	0,830	0,446

Anhang 12: Kalibriergerade von DC-Chol in DC-Chol – Vesikeln (30/ x/ y)

CH₂Cl₂	SPC [5 µg/µl]	Polysorbat [5 µg/µl]	DC-Chol [1 µg/µl]	Phos. puffer	Ac₂O	H₂SO₄ konz.	Mittelwert A₆₁₆ nm	rel. St.abw. [%]
512	24,5	13,5	0	10	400	40	0,002	53,4
511	24,5	13,5	1	10	400	40	0,005	14,1
510	24,5	13,5	2	10	400	40	0,012	7,8
507	24,5	13,5	5	10	400	40	0,028	1,1
502	24,5	13,5	10	10	400	40	0,055	3,3
492	24,5	13,5	20	10	400	40	0,112	1,6
482	24,5	13,5	35	10	400	40	0,199	2,5
462	24,5	13,5	50	10	400	40	0,281	1,0

Anhang 13: Kalibriergerade von DC-Chol in DC-Chol – Vesikeln (30/24/ z)

CH₂Cl₂	SPC [5 µg/µl]	Polysorbat [5 µg/µl]	DC-Chol [1 µg/µl]	Phos. puffer	Ac₂O	H₂SO₄ konz.	Mittelwert A₆₁₆ nm	rel. St.abw. [%]
358	83	109	0	10	400	40	0,006	16,7
353	83	109	5	10	400	40	0,037	6,7
348	83	109	10	10	400	40	0,068	2,9
338	83	109	20	10	400	40	0,130	2,5
318	83	109	40	10	400	40	0,253	2,6
298	83	109	60	10	400	40	0,377	1,9

Anhang 14: DC-Chol-Bestimmung in den 30/x/y – Formulierungen

Vesikel (TL je 10 %)	V _{Probe} [μl]	m _{DC-Chol} [μg]	A _{616 nm theor.}	Mittelwert A _{616 nm tats.}	rel. St.abw. [%]
30/10/5 nach Filtration	10	63,1	0,3534	0,3948	6,2
30/10/8,4 nach Filtration	5	59,3	0,3325	0,2786	9,2
30/20/9,8 nach Filtration	5	82,9	0,4645	0,2268	7,2

Anhang 15: DC-Chol-Bestimmung in den 30/24/z – Formulierungen

Probe	Vol. [μl]	CH ₂ Cl ₂ [μl]	Ac ₂ O [μl]	H ₂ SO ₄ [μl]	Meßwert			Mitt.- wert	σ _{rel.} [%]
					M1	M2	M3		
30/ 24/ 3 vor Filtrat.	10	550	400	40	0,169	0,160	0,172	0,167	3,7
30/ 24/ 3 nach 0,5 MPa	10	550	400	40	0,163	0,158	0,170	0,164	3,7
30/ 24/ 3 nach 0,7 MPa	10	550	400	40	0,167	0,164	0,163	0,165	1,3
30/ 24/ 3 nach 0,9 MPa	10	550	400	40	0,168	0,169	0,168	0,168	0,3
30/ 24/ 6 vor Filtrat.	10	550	400	40	0,330	0,319	0,325	0,325	1,7
30/ 24/ 6 nach 0,5 MPa	10	550	400	40	0,318	0,321	0,322	0,320	0,6
30/ 24/ 6 nach 0,7 MPa	10	550	400	40	0,330	0,313	0,324	0,322	2,7
30/ 24/ 6 nach 0,9 MPa	10	550	400	40	0,332	0,316	0,322	0,323	2,5

Anhang 16: DC-Chol-Bestimmung in den DNS-DC-Chol – Vesikeln

SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/4	Vol. [μl]	CH ₂ Cl ₂ [μl]	Ac ₂ O [μl]	H ₂ SO ₄ [μl]	Meßwert			Mitt.- wert	σ _{rel.} [%]
					M1	M2	M3		
TL 1 %, 14 μg DNS, vor Filtr.	20	540	400	40	0,053	0,057	0,060	0,057	6,2
TL 1 %, 28 μg DNS, vor Filtr.	20	540	400	40	0,055	0,053	0,058	0,055	4,5
TL 1 %, 56 μg DNS, vor Filtr.	20	540	400	40	0,054	0,056	0,058	0,056	3,6
TL 1 %, 14 μg DNS, n. 1,0 MPa	20	540	400	40	0,055	0,059	0,057	0,057	3,5
TL 1 %, 28 μg DNS, n. 1,0 MPa	20	540	400	40	0,058	0,054	0,057	0,056	3,7
TL 1 %, 56 μg DNS, n. 1,0 MPa	20	540	400	40	0,052	0,053	0,054	0,053	1,9
TL 10 %, 562 μg DNS, vor Filtr.	5	555	400	40	0,145	0,140	0,150	0,145	3,4
TL 10 %, 562 μg DNS, n. 0,4 MPa	5	555	400	40	0,146	0,142	0,148	0,145	2,1
TL 10 %, 562 μg DNS, n. 0,7 MPa	5	555	400	40	0,128	0,123	0,130	0,127	2,8
TL 10 %, 562 μg DNS, n. 0,9 MPa	5	555	400	40	0,131	0,131	0,138	0,133	3,0

Anhang 17: Kalibriergerade von DNS in DC-Chol – Vesikeln

Nr.	Vesikel 30/10/4		DNS		EtBr	Ph.puf.	Messungen					Statistik	
	TL	V	Konz.	V	V	V	M1	M2	M3	M4	M5	Mitt.wert	rel. St.abw.
	[%]	[µl]	[ng/µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[Fluoreszenzeinheiten]					[Fluor.e.]	[%]
ohne Lipidvesikel													
1	1	0	10	0	5	995	1,7	1,8	1,7	1,8	1,7	1,74	3,1
2	1	0	10	10	5	985	1,9	1,8	1,9	1,7	1,9	1,84	4,9
3	1	0	10	20	5	975	2,0	2,1	1,9	1,9	1,9	1,96	4,6
4	1	0	10	50	5	945	2,2	2,3	2,3	2,3	2,3	2,28	2,0
5	1	0	10	120	5	875	3,0	3,0	2,9	3,1	3,0	3,00	2,4
mit Lipidvesikeln													
6	1	20	10	0	5	975	1,8	1,7	1,8	1,8	1,7	1,76	3,1
7	1	20	10	10	5	965	1,9	2,0	1,9	1,8	1,8	1,88	4,5
8	1	20	10	20	5	955	2,0	1,9	2,0	2,1	2,0	2,00	3,5
9	1	20	10	50	5	925	2,3	2,4	2,3	2,3	2,4	2,34	2,3
10	1	20	10	120	5	855	3,1	3,0	3,1	3,0	3,1	3,06	1,8

Anhang 18: DNS-Quantifizierung in diversen DNS-DC-Chol – Vesikeln

Nr.	Ves.	DNS	Bemerkungen	Probe	EtBr	Ph.puf.	Meßwert					Mitt.	$\sigma_{rel.}$
	TL	[μ g]		V [μ l]	V [μ l]	V [μ l]	M1	M2	M3	M4	M5	wert	[%]
1	1 %	14,06	vor Filtrat.	20	5	975	2,0	2,1	2,1	2,1	2,1	2,08	2,2
2	1 %	28,12	vor Filtrat.	20	5	975	2,4	2,4	2,4	2,3	2,4	2,38	1,9
3	1 %	56,24	vor Filtrat.	20	5	975	2,9	3,0	3,0	3,1	3,0	3,00	2,4
4	1 %	14,06	nach 1,0 MPa	20	5	975	2,1	2,0	2,1	2,1	2,2	2,10	3,4
5	1 %	28,12	nach 1,0 MPa	20	5	975	2,3	2,4	2,3	2,4	2,5	2,38	3,5
6	1 %	56,24	nach 1,0 MPa	20	5	975	2,9	2,9	2,8	2,7	2,9	2,84	3,1
7	10 %	562,4	vor Filtrat.	2	5	993	2,4	2,4	2,3	2,3	2,4	2,36	2,3
8	10 %	562,4	nach 0,4 MPa	2	5	993	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,40	0,0
9	10 %	562,4	nach 0,7 MPa	2	5	993	2,4	2,4	2,5	2,3	2,3	2,38	3,5
10	10 %	562,4	nach 0,9 MPa	2	5	993	2,4	2,3	2,5	2,5	2,4	2,42	3,5

Anhang 19: Zusammensetzung der für die *in vitro* Experimente eingesetzten DNS-Vesikel

SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/5												
1,6 µg EGFP – DNS (c = 1 µg/µl)												
DNS:Lipid – Verhältnis = 1:11,8							DNS:Lipid – Verhältnis = 1:5,9					
TL [%]	10	5	1	0,2	Fugene	Negat.	10	5	1	0,2	Fugene	Negat.
Σ _{DNS} [µl]	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40	-
Σ _{vesikel} [µl]	9,20	18,40	92,00	460,0	25,60	-	4,60	9,20	46,00	230,0	25,60	9,20
V _{MEM} [µl]	84,40	75,20	1,60	-	68,00	93,60	89,00	84,40	47,60	-	68,00	90,80
0,4 µg EGFP – DNS (c = 1 µg/µl)												
DNS:Lipid – Verhältnis = 1:11,8							DNS:Lipid – Verhältnis = 1:5,9					
TL [%]	10	5	1	0,2	Fugene	Negat.	10	5	1	0,2	Fugene	Negat.
Σ _{DNS} [µl]	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	-
Σ _{vesikel} [µl]	2,30	4,60	23,00	115,0	6,40	-	1,15	2,30	11,50	57,50	6,40	2,30
V _{MEM} [µl]	96,10	93,80	75,40	-	92,00	98,40	97,25	96,10	86,90	40,90	92,00	97,70
0,1 µg EGFP – DNS (c = 1 µg/µl)												
DNS:Lipid – Verhältnis = 1:11,8							DNS:Lipid – Verhältnis = 1:5,9					
TL [%]	10	5	1	0,2	Fugene	Negat.	10	5	1	0,2	Fugene	Negat.
Σ _{DNS} [µl]	nicht ange- setzt (Vol. zu gering)		0,40	0,40	0,40	0,40	nicht ange- setzt (Vol. zu gering)		0,40	0,40	0,40	-
Σ _{vesikel} [µl]			5,80	29,00	1,60	-			2,90	14,50	1,60	0,60
V _{MEM} [µl]			93,80	70,60	98,0	99,60			96,70	85,10	92,00	99,40

SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/10/8,4												
1,6 µg EGFP – DNS (c = 1 µg/µl)												
DNS:Lipid – Verhältnis = 1:11,8							DNS:Lipid – Verhältnis = 1:5,9					
TL [%]	10	5	1	0,2	Fugene	Negat.	10	5	1	0,2	Fugene	Negat.
Σ _{DNS} [µl]	6,40	6,40	6,40	6,40	-	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40	-	-
Σ _{vesikel} [µl]	4,90	9,80	49,00	245,0	-	-	2,45	4,90	24,50	122,5	-	-
V _{MEM} [µl]	88,70	83,80	44,60	-	-	93,60	91,15	88,70	69,10	-	-	-
0,4 µg EGFP – DNS (c = 1 µg/µl)												
DNS:Lipid – Verhältnis = 1:11,8							DNS:Lipid – Verhältnis = 1:5,9					
TL [%]	10	5	1	0,2	Fugene	Negat.	10	5	1	0,2	Fugene	Negat.
Σ _{DNS} [µl]	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	nicht	1,60	1,60	1,60	-	-
Σ _{vesikel} [µl]	1,23	2,46	12,30	61,50	6,40	-	anges.	0,62	1,23	6,15	-	-
V _{MEM} [µl]	97,17	95,94	86,10	36,90	92,00	98,40	(s.o.)	97,78	97,17	92,25	-	-
0,1 µg EGFP – DNS (c = 1 µg/µl)												
DNS:Lipid – Verhältnis = 1:11,8							DNS:Lipid – Verhältnis = 1:5,9					
TL [%]	10	5	1	0,2	Fugene	Negat.	10	5	1	0,2	Fugene	Negat.
Σ _{DNS} [µl]	0,40	0,40	0,40	0,40	-	0,40	nicht	0,40	0,40	0,40	-	-
Σ _{vesikel} [µl]	0,31	0,62	3,10	15,50	-	-	anges.	0,31	1,55	7,75	-	-
V _{MEM} [µl]	99,29	98,98	96,50	84,10	-	99,60	(s.o.)	99,29	98,05	91,85	-	-

SPC/Polysorbat/DC-Chol 30/20/9,8												
1,6 µg EGFP – DNS (c = 1 µg/µl)												
DNS:Lipid – Verhältnis = 1:11,8							DNS:Lipid – Verhältnis = 1:5,9					
TL [%]	10	5	1	0,2	Fugene	Negat.	10	5	1	0,2	Fugene	Negat.
Σ_{DNS} [µl]	6,40	6,40	6,40	6,40	-	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40	-	-
Σ_{vesikel} [µl]	3,51	7,02	35,10	175,5	-	-	1,76	3,52	17,60	88,00	-	-
V_{MEM} [µl]	90,09	86,58	58,50	-	-	93,60	91,84	90,08	76,00	5,60	-	-
0,4 µg EGFP – DNS (c = 1 µg/µl)												
DNS:Lipid – Verhältnis = 1:11,8							DNS:Lipid – Verhältnis = 1:5,9					
TL [%]	10	5	1	0,2	Fugene	Negat.	10	5	1	0,2	Fugene	Negat.
Σ_{DNS} [µl]	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	-	-
Σ_{vesikel} [µl]	0,88	1,76	8,80	44,00	6,40	-	0,44	0,88	4,40	22,00	-	-
V_{MEM} [µl]	97,52	96,64	89,60	54,40	92,00	98,40	97,96	97,58	94,00	76,40	-	-
0,1 µg EGFP – DNS (c = 1 µg/µl)												
DNS:Lipid – Verhältnis = 1:11,8							DNS:Lipid – Verhältnis = 1:5,9					
TL [%]	10	5	1	0,2	Fugene	Negat.	10	5	1	0,2	Fugene	Negat.
Σ_{DNS} [µl]	nicht	0,40	0,40	0,40	-	0,40	nicht	0,40	0,40	0,40	-	-
Σ_{vesikel} [µl]	anges.	0,88	4,40	22,00	-	-	anges.	0,44	2,20	11,00	-	-
V_{MEM} [µl]	(s.o.)	98,72	95,20	77,60	-	99,60	(s.o.)	99,16	97,40	88,60	-	-

Lebenslauf

26. 05. 1972	Dirk Häfner, geboren in Bruchsal als Kind von Bernd und Edeltraud Häfner (beide Apotheker)
1978 – 1982	Grundschule Mannheim-Friedrichsfeld
1982 – 1991	Lessing-Gymnasium Mannheim
1991	Abitur
07/1991 – 10/1992	Zivildienst auf der Internistischen Intensivstation des Theresienkrankenhauses Mannheim
10/1992 – 03/1997	Pharmaziestudium in Freiburg
03/1993	Famulatur in der Schelkes-Apotheke in Freiburg
08/1993	Famulatur in der Apotheke des Theresienkrankenhauses Mannheim
03/1995	1. Staatsexamen
03/1997	2. Staatsexamen
05/1997 – 10/1997	Pharmaziepraktikum in der Kloster-Apotheke in Oberried (bei Freiburg)
11/1997 – 04/1998	Pharmaziepraktikum bei der Bayer® AG in Leverkusen
06/1998	3. Staatsexamen und Approbation als Apotheker
07/1998 – 10/1998	dreimonatiges Praktikum bei der Bayer® AG in Barcelona
10/1998 – 03/2002	Doktorand bei der IDEA AG in München
05/2000 – 03/2002	Teilzeitbeschäftigung in der Europa – Apotheke in München
07/2000	Herausgabe des Arbeitsbuches „Qualitative Anorganische Analyse“ im GOVI – Verlag
seit 04/2002	Anstellung in der Isabella – Apotheke in München
seit 05/2002	Anstellung in der Barbara – Apotheke in München